

Biosynthese des Isobakteriochlorins Häm d_1 :
Charakterisierung der Proteine NirJ und NirDLGH aus
Pseudomonas aeruginosa

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Johannes Marten Walther
aus München

1. Referentin: Dr. Gunhild Layer

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 11.07.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.08.2011

Druckjahr 2011

„In der Schule haben wir gelernt, dass Lehrerwissen absolutes Wissen ist. Doch Wissenschaft kann niemals absolut sein. Sie ist die Kunst der Annäherung. Sie definiert nicht, sondern kreist ein, zieht keine Trennlinien, sondern schafft Übergänge, kennt keine Dogmen, sondern Entwicklungen. Sie kann nichts verifizieren, sondern nur durch Wegstreichen von Variablen ein möglichst klares Bild entwerfen.“

Frank Schätzing
Nachrichten aus einem unbekannten Universum: Eine Zeitreise durch die Meere

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Glossar	v
1. Einleitung	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als humanpathogenes Bakterium	2
1.1.2 Biofilmwachstum von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2 Anpassung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> an Sauerstoff-limitierende Bedingungen	4
1.2.1 Fermentation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.2.2 Denitrifikation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.2.3 Regulation des anaeroben Metabolismus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3 Das <i>nir</i> -Operon in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.3.1 Die Nitritreduktase NirS	9
1.3.2 Die Cytochrome NirM und NirC	10
1.3.3 Die Methyltransferase NirE	11
1.3.4 Hypothetische Funktionen der Proteine NirF, NirDLGH, NirJ und NirN	12
1.3.4.1 NirF	12
1.3.4.2 NirN	13
1.3.4.3 NirJ	13
1.3.4.4 NirD, NirL, NirG und NirH (NirDLGH)	14
1.4 Die Familie der AsnC/Lrp-Transkriptionsregulatoren	15
1.5 Tetrapyrrole	17
1.5.1 Struktur der Tetrapyrrole	17
1.5.2 Bedeutung der Tetrapyrrole	18
1.5.3 Biosynthese der Tetrapyrrole	18
1.5.3.1 Biosynthese von Uroporphyrinogen III	19
1.5.3.2 Häm <i>d</i> ₁	20
1.6 Zielsetzung	22
2. Materialien und Methoden	23
2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	24
2.1.3 Hilfsmittel	26
2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	27
2.2.1 Bakterienstämme	27
2.2.2 Plasmide	28
2.2.3 Oligonukleotide	31
2.3 Medien und Medienzusätze	33
2.3.1 Medien	33
2.3.2 Medienzusätze	33
2.4 Mikrobiologische Arbeitstechniken	34
2.4.1 Sterilisation	34

2.4.2	Bakterienkultivierung	34
2.4.3	Bestimmung der Zelldichte	35
2.4.4	Lagerung von Bakterien	35
2.5	Molekularbiologische Techniken	36
2.5.1	Herstellung und Transformation von chemokompetenten <i>E.coli</i> Zellen durch Calciumchlorid	36
2.5.2	Präparation von Plasmid-DNA	36
2.5.3	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	37
2.5.4	Trennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese	37
2.5.5	Amplifikation von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.5.6	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	38
2.5.7	Ligation von DNA	39
2.5.8	Sequenzierung	39
2.5.9	β -Galaktosidaseaktivitätsanalysen	39
2.5.10	Gelretardationsanalysen	40
2.5.11	DNaseI-Protektionsanalysen, Kontaktblot und Detektion	41
2.5.12	Primer-Extension-Analysen	44
2.5.13	Biparental Mating	44
2.6	Proteinbiochemische Methoden	45
2.6.1	Rekombinante Proteinproduktion	45
2.6.1.1	Produktion der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH	46
2.6.1.2	Produktion des Proteins NirJ	46
2.6.1.3	Produktion des Proteins NirA	47
2.6.1.4	Produktion des Proteins CysG	48
2.6.1.5	Produktion des Proteins NirDL	48
2.6.2	Zellaufschluss und Ultrazentrifugation	48
2.6.3	Proteinreinigung durch Metallchelataffinitätschromatographie	49
2.6.4	Umpufferung von Proteinlösungen	50
2.6.5	Extraktion von Sirohäm	50
2.7	Proteincharakterisierung	50
2.7.1	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.7.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.7.3	Western Blot und Nachweis von Proteinen mittels Ponceau S	52
2.7.4	N-terminale Sequenzierung	53
2.7.5	Gelpermeationschromatographie	54
2.7.6	Eisen- und Schwefelbestimmung	54
2.8	Analytik	56
2.8.1	Massenspektrometrie	56
2.8.2	UV/Vis-Spektroskopie	56
2.8.3	Fluoreszenz-Spektroskopie	56
2.8.4	Tetrapyrrolanalyse mittels HPLC	57
2.9	Enzymaktivitätstests	58
2.9.1	<i>In vitro</i> -Aktivitätstests ausgehend von 5-Aminolävulinsäure	58
2.9.2	<i>In vitro</i> -Aktivitätstests ausgehend von gereinigtem Sirohäm	59
2.10	Proteinkristallisation	59

3.	Ergebnisse und Diskussion	61
3.1	Initiale biochemische Charakterisierung des Proteins NirJ	61
3.1.1	Präparation des Proteins NirJ	61
3.1.2	Biochemische Charakterisierung des Proteins NirJ aus <i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	63
3.2	Charakterisierung der Proteine NirDLGH aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
3.2.1	Präparation der Proteine NirDLGH	66
3.2.1.1	Produktion, Reinigung und Analyse des Oligomerenstatus der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH	66
3.2.1.2	Klonierung, Produktion, Reinigung und Analyse des Oligomerenstatus der Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H	69
3.2.2	Untersuchung der enzymatischen Aktivität der Proteine NirDLGH	73
3.2.2.1	Klonierung, Produktion und Reinigung des Proteins CysG aus <i>Escherichia coli</i>	73
3.2.2.2	Produktion und Reinigung des Proteins NirA aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
3.2.2.3	Extraktion des Kofaktors Sirohäm	77
3.2.2.4	UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Kofaktors Sirohäm	77
3.2.2.5	Massenspektroskopische Untersuchung des Kofaktors Sirohäm	78
3.2.2.6	Decarboxylierung von Sirohydrochlorin zu 12,18-Didecarboxysirohydrochlorin	81
3.2.2.7	Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm	82
3.2.3	Charakterisierung der Proteine NirDLGH als Transkriptionsregulatoren	84
3.2.3.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von <i>nirJEN</i>	84
3.2.3.2	Untersuchung der <i>nirJ</i> -Promotoraktivität	86
3.2.3.3	Eingrenzung der <i>nirJ</i> -Promotorregion durch verkürzte <i>nirJ'</i> - <i>lacZ</i> -Reportergenkonstrukte	88
3.2.3.4	Einfluss der Proteine NirDLGH auf die Aktivität des <i>nirJ</i> -Promotors	89
3.2.3.5	DNA-Protein Bindungsstudien mittels Gelretardationsexperimenten	92
3.2.3.6	Bestimmung der Transkriptionsfaktorbindestelle mittels DNaseI-Protektionsanalysen	99
3.2.3.7	Beteiligung des <i>Integration Host Factors</i> (IHF) an der Regulation der Gene <i>nirJEN</i>	101
3.2.4	Proteinkristallisation zur Strukturaufklärung der Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H	104
3.2.5	Modell zur Funktionalität von NirDLGH aus <i>P. aeruginosa</i>	106
4.	Zusammenfassung	111

5. Summary	113
6. Ausblick	114
7. Literaturverzeichnis	115
Danksagung	126
Lebenslauf	128

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

A	Ampere
Å	Ångström
ALA, 5-ALA, δ -ALA	5-Aminolävulinsäure
°C	Grad Celsius
x g	Erdbeschleunigung
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin-resistent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B-ME	β -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („ <i>bovine serum albumin</i> “)
Bw	Backward
Cm	Chloramphenicol
Cm ^r	Chloramphenicol-resistent
Δ	Deletionsmutante
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleintriphosphat
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Gelretardationsassay, Band Shift
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtOH	Ethanol
Fw	Forward
Gm	Gentamycin
Gm ^r	Gentamycin-resistent
GPC	Gelpermeationschromatographie

h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
JCSG	Joint Center for Structural Genomics
Kan	Kanamycin
Kan ^r	Kanamycin-resistent
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1000 bp)
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 Da)
Konz.	Konzentration
L	Liter
Λ	Wellenlänge
LB	Luria-Bertani (Medium)
μ	micro
M	Molar
M _r	relative molekulare Masse
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
n	nano
NaOAc	Natriumacetat
NirDLGH	Alle vier Proteine betreffend, unabhängig evtl. Proteinkomplexe
NirD/L, NirG/H	Die Proteinkomplexe betreffend
NirD, NirL, NirG, NirH	Die Einzelproteine betreffend
OD _{λ}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge λ in nm
ORF	Offenes Leseraster („open reading frame“)
<i>p.a.</i>	Reinheitsgrad „ <i>pro analysi</i> “
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
psi	Pounds per square inch (Druckeinheit)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rel.	relativ(e)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
s	Sekunde(n)
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
Tet ^r	Tetrazyklin-resistent
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
u	1/12 der Masse eines C-Atoms
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
(w/v)	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
WT	Wildtyp
V	Volt
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein Gram-negatives γ -Proteobakterium aus der Familie der Pseudomonadaceae. Es wurde im Jahr 1900 von Walter Migula entdeckt. *P. aeruginosa* ist stäbchenförmig mit einer Größe von circa $0,5\text{--}1 \times 1,5\text{--}4 \mu\text{m}$ und polar begeißelt (Madigan *et al.*, 2002). Im Jahr 2000 wurde sein Genom vollständig sequenziert. Es enthält 5761 vorhergesagte Open Reading Frames (ORFs) bei einer Genomgröße von 6,3 Mbp (Stover *et al.*, 2000, Winsor *et al.*, 2009). Weitere Charakteristika von *P. aeruginosa* sind der süßliche Geruch, ausgelöst durch Aminoacetophenon, und die namensgebende grünliche Färbung, verursacht durch das Fluorophor Pyoverdin und das Phenanzinderivat Pyocyanin (Mann, 1966). *P. aeruginosa* kommt ubiquitär vor und besitzt einen sehr vielfältigen Stoffwechsel. So ist es in der Lage, das Biotensid Rhamnolipid zu bilden, welches industriell genutzt wird (Deziel *et al.*, 2003), und das Detergenz SDS abzubauen (Cain, 2004). Auf Grund seiner metabolischen Vielfalt kann das Bakterium sowohl aerob als auch anaerob überleben.

Abbildung 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums *P. aeruginosa*.



Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums *P. aeruginosa*. Rot eingefärbt sind die *P. aeruginosa*-Bakterien (www.sciencephoto.com). Deutlich erkennbar ist die stäbchenförmige Gestalt.

1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* als humanpathogenes Bakterium

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Pflanzen-, Tier und Humanpathogen (Rahme *et al.*, 1995). Das Bakterium konnte aus einer Vielzahl von humanen Wirten isoliert werden, z.B. aus Brandwunden und Harnwegsinfektionen, aber auch aus Augeninfektionen (Stryjewski & Sexton, 2003). Die Tatsache, dass es besonders immungeschwächte Patienten infiziert und zur Multiresistenzbildung neigt, erschwert die Behandlung und führt zu kumulierten Epidemien in Krankenhäusern (Van Delden & Iglewski, 1998 und Hasset *et al.*, 2009). Besonders schwerwiegend sind Infektionen im Respirationstrakt. Dies tritt verstärkt bei Patienten auf, die an Mukoviszidose leiden. Bei dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheit kommt es zu einer gesteigerten Natrium- und Chloridabsorption (O'Sullivan & Freedman, 2009). Durch den gesteigerten lokalen Salzgehalt wird dem umliegenden Gewebe durch osmotische Effekte Wasser entzogen. Dies führt in der Lunge zu einer Anlagerung eines zähflüssigen Sekrets, welches die Zilien nicht mehr abtransportieren können. Schleim und Schmutzstoffe können so nicht mehr aus dem Respirationstrakt transportiert werden (Worlitzsch *et al.*, 2002). Dieses Sekret bildet damit ein Nährmedium für bakterielle Infektionen, z.B. durch *P. aeruginosa*. Diese Infektionen führen zu einer Schädigung des angrenzenden Lungengewebes durch die ausgelöste Immunantwort mit oftmals letalen Folgen (Campodonico *et al.*, 2008).

Aus biophysiologicaler Sicht entsteht innerhalb des angelagerten Sekrets ein Sauerstoffgradient. Je dicker die Sekretschicht ist, umso größere microaerophile Bereiche entstehen. Sogar anaerobe Bereiche in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten konnten beobachtet werden. Aus dem Respirationstrakt von Patienten, die an cystischer Fibrose leiden, wurden *P. aeruginosa*-Bakterien isoliert, welche das Sekret in biofilmähnlichen Mikrokolonien besiedelten (Worlitzsch *et al.*, 2002).

1.1.2 Biofilmwachstum von *Pseudomonas aeruginosa*

Der Übergang von einer planktonischen Lebensweise zu einem Biofilmwachstum ist mit einer physiologischen Veränderung der Bakterien verbunden. Für den Aufbau einer Biofilmmatrix sind extrazelluläre polymere Substanzen wie z.B. Polysaccharide, DNA, Lipide, Proteine, Alginat und die bereits erwähnten

Rhamnolipide notwendig (Moraue-Marquis *et al.*, 2008). Der Aufbau eines Biofilms erfolgt in fünf Schritten. Abbildung 2 zeigt detailliert die Entstehung eines Biofilms.

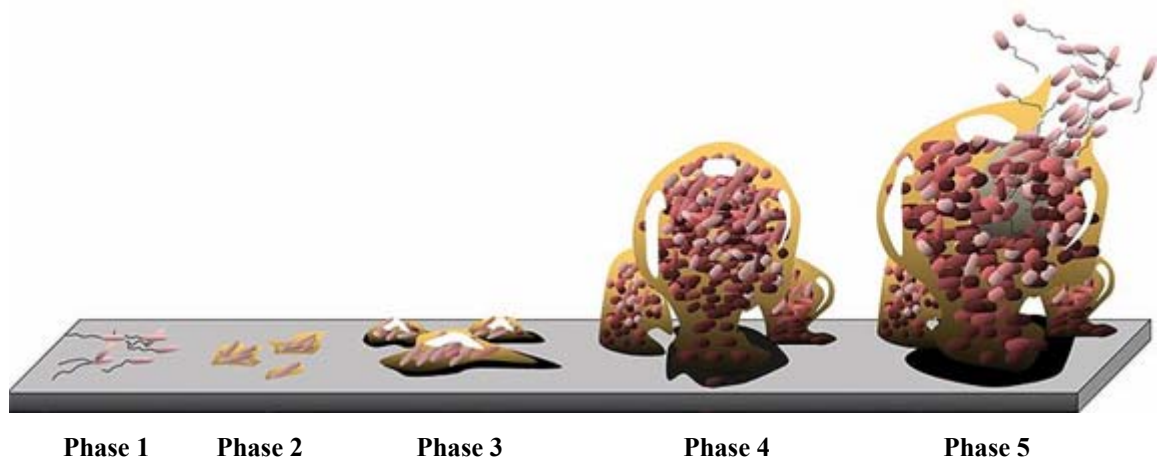


Abbildung 2: Entstehung eines Biofilms (nach Monroe, 2007).
 Der Aufbau eines Biofilms erfolgt in fünf Schritten. In der ersten Phase lagern sich Bakterien, z.B. *P. aeruginosa* reversibel an eine Oberflächengrenzschicht an. In Phase 2 folgt dann eine irreversible Anlagerung. Dies geschieht durch eine Vielzahl von physiologischen Adaptionen, wie z.B. dem Verlust der Begeißelung und beginnender Rhamnolipidproduktion. Die Phasen 3 und 4 werden Maturationsphasen I und II genannt. Hier kommt es zum Wachstum des Biofilms und zur Ausbildung von microaerophilen und anaeroben Bereichen. Der Kernbereich ist hierbei in der Regel kompakt und regelmäßig, die äußeren Bereiche sind lockerer aufgebaut. Der gesamte Biofilm kann dabei von Kanälen und Poren durchzogen sein, die einen Wasser- und Metabolitransport ermöglichen. Die fünfte Phase wird als Dispersionphase bezeichnet. Sie ist durch die beginnende Auflösung des Biofilms gekennzeichnet.

Die Entstehung des Biofilms ist dabei streng reguliert. Als Auslöser für die Akkumulation eines Biofilms werden beispielsweise Eisenlimitierung (Yang *et al.*, 2007), Nährstoffmangel (Heydorn *et al.*, 2002) oder Antibiotikabehandlung (Hoffmann *et al.*, 2005) beschrieben. Neben dem Schutz vor mechanischer Beanspruchung ergeben sich aus einem Biofilm weitere Vorteile für die Bakterien, wie z.B. die gemeinsame Nutzung von Siderophoren (Banin *et al.*, 2005) oder ein verlangsamtes Zellwachstum, was zu einem Schutz vor bakteriostatischen Antibiotika führt (Mah & O'Toole, 2001).

Die Maturation des Biofilms wird über N-Acylhomoserin (Kjelleberg & Molin, 2002), den Sigmafaktor σ^S (Schuster *et al.*, 2004) und den Typ III-Sekretionssystemsregulator SadARS (Kuchma *et al.*, 2005) gesteuert. Wie bereits erwähnt, sind der Aufbau und die Stabilität des Biofilms dabei von den produzierten extrazellulären Polymeren abhängig (Moraue-Marquis *et al.*, 2008).

Es wurde gezeigt, dass die Dispersion eines Biofilms beispielsweise durch Temperatur- bzw. pH-Wechsel (Sauer *et al.*, 2004), Sauerstoffverfügbarkeit

(Thormann *et al.*, 2005) oder EDTA (Banin *et al.*, 2006) ausgelöst wurde. Die Auflösung des Biofilms wird dabei durch die Produktion von Exopolysaccharidlyasen und DNasen beschleunigt (Allison *et al.*, 1998).

1.2 Anpassung von *Pseudomonas aeruginosa* an Sauerstoff-limitierende Bedingungen

In Kapitel 1.1.2 wurde beschrieben, dass in einem Biofilm neben aeroben auch microaerophile und anaerobe Regionen vorliegen. *P. aeruginosa* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium. Unter aeroben Bedingungen dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor zur Energiegewinnung mittels aerober Atmung. *P. aeruginosa* ist zudem in der Lage, anaerob zu atmen. Hierbei wird Nitrat im Prozess der Denitrifikation reduziert (Zumft, 1997). Des Weiteren ist *P. aeruginosa* in der Lage, Arginin- und Pyruvatfermentation durchzuführen (Van der Wauven *et al.*, 1984 und Eschbach *et al.*, 2004).

1.2.1 Fermentation in *Pseudomonas aeruginosa*

Sowohl die Arginin- als auch die Pyruvatfermentation wird genetisch induziert, sobald Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor nicht mehr zur Verfügung steht. Die Regulation erfolgt hierbei über das Protein Anr, welches später in diesem Kapitel näher erläutert wird.

Bei der Argininfermentation wird Arginin zu Ornithin, CO₂ und einem Ammoniumion umgewandelt. Hierbei entsteht pro Molekül Arginin ein Molekül ATP. Die beteiligten Reaktionsschritte werden hierbei von Enzymen katalysiert, die durch die Gene des *arcDABC* Genclusters kodiert sind (nach Steen, 2011).

Bei der Pyruvatfermentation wird Pyruvat in Succinat, Acetat oder Lactat umgewandelt. Die Pyruvatfermentation dient dabei nicht dem eigentlichen Zellwachstum, sondern sichert das Langzeitüberleben der Zellen (Eschbach *et al.*, 2004).

1.2.2 Denitrifikation in *Pseudomonas aeruginosa*

Unter Denitrifikation versteht man die stufenweise Reduktion von Nitrat bzw. Nitrit, welche als externe Elektronenakzeptoren dienen, zu molekularem Stickstoff (Abbildung 3 und 4). Sie wird auch als anaerobe Atmung bezeichnet und ist der effizienteste Weg der anaeroben Energiegewinnung (Zumft, 1997).

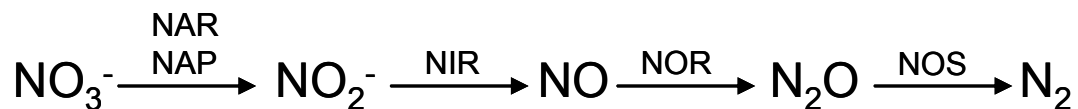


Abbildung 3:

Denitrifikation in *P. aeruginosa* (nach Zumft, 1997).

Nitrat (NO_3^-) wird durch die membranständige Nitratreduktase (NAR) oder die periplasmatische Nitratreduktase (NAP) zu Nitrit (NO_2^-) reduziert. Anschließend wird NO_2^- mittels der Cytochrom cd_1 Nitritreduktase (NIR) zu Stickstoffmonoxid (NO) umgewandelt. Im Anschluss daran katalysiert die Stickstoffmonoxidreduktase (NOR) die Reaktion von NO zu Distickstoffmonoxid (N_2O). Im letzten Schritt der Denitrifikation erfolgt die Umwandlung von N_2O zu N_2 durch die Distickstoffmonoxidreduktase (NOS).

Die cytoplasmatische Reduktion von Nitrat zu Nitrit wird von Proteinen, die durch Gene des Genclusters *narK₁K₂GHIJ* kodiert sind, katalysiert. Die Regulation erfolgt hierbei über Anr, Dnr und NarXL, welche später in diesem Kapitel näher beschrieben werden (William *et al.*, 2007 und Schreiber *et al.*, 2007). NarK₁ und NarK₂ sind transmembrane Antiporter, welche für die Aufnahme von Nitrat und die Abgabe von Nitrit zuständig sind (Sharma *et al.*, 2006). Der Proteinkomplex NarGHI stellt die eigentliche Nitratreduktase dar. Detailliert betrachtet ist NarI ein membranständiges Cytochrom *b*, welches Elektronen aus dem Chinonpool der Membran an das cytoplasmatisch membranassoziierte Eisen-Schwefel-Protein NarH weitergibt. NarH wiederum überträgt die Elektronen auf die katalytisch aktive im Cytoplasma lokalisierte Untereinheit NarG, welche über einen Molybdän-Kofaktor verfügt (Zumft, 1997). Eine weitere, jedoch periplasmatische, Nitratreduktase wird durch Gene des Operons *napABCDEF* kodiert (Schreiber *et al.*, 2007).

Der zweite Schritt der Denitrifikation, die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid, wird durch die sogenannte Cytochrom cd_1 -Nitritreduktase katalysiert, welche durch das *nirS*-Gen im *nir*-Operon kodiert ist (Arai *et al.*, 1995 a). Eine detaillierte Analyse des Genclusters *nirSMCFDLGHJEN* ist Bestandteil dieser Arbeit und wird in einem späteren Kapitel behandelt.

Der von Dnr regulierte Proteinkomplex NorBC, kodiert durch das Gencluster *norCBD* katalysiert die Reduktion von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid (Arai *et al.*, 2003). Die membranständige katalytisch aktive Untereinheit NorB, welche zusätzlich nicht-Häm-assoziiertes Eisen enthält, ist ein Cytochrom *b*. Bei NorC handelt es sich um ein, ebenfalls in der Membran verankertes, Cytochrom *c* (Arai *et al.*, 1995 b).

Zuletzt erfolgt die Reduktion von Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff. Die beteiligten Proteine sind durch Gene des *nos*-Operons (*nosRZDFYL*) kodiert. Entscheidend für die Distickstoffmonoxid-Reduktion sind die vier Kupferzentren der homodimeren N_2O -Reduktase NosZ, an deren Einbau die Proteine NosDFY beteiligt sind. Bei NosR handelt es sich um einen hypothetischen Regulator der Aktivität von NosZ (Zumft, 1997; Zumft und Kroneck, 2006 und Steen, 2011).

Abbildung 4 zeigt zusammenfassend einen schematischen Überblick über die Lokalisation der an der Denitrifikation in *P. aeruginosa* beteiligten Proteine und deren enzymatisch katalysierte Reaktionen.

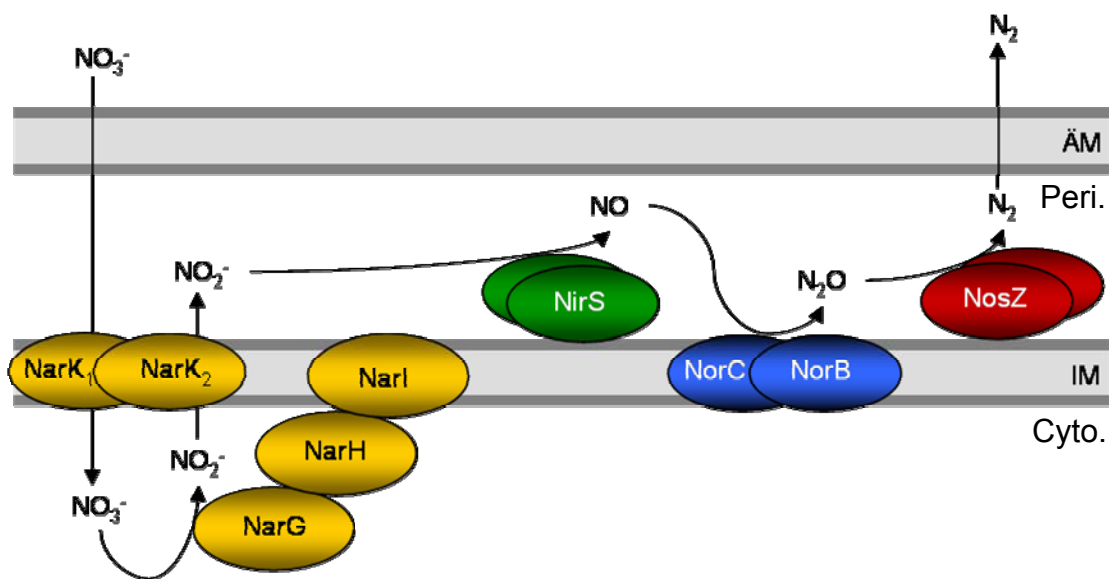


Abbildung 4: Lokalisation und Katalyse der an der Denitrifikation in *P. aeruginosa* beteiligten Proteine (nach Zumft, 1997 und Steen, 2011).

Gelb dargestellt ist der erste Schritt der Denitrifikation, der Transport von NO_3^- (NarK₁/K₂), die Reduktion von NO_3^- zu NO_2^- (NarGHI) und der Transport von NO_2^- (NarK₁/K₂). Grün dargestellt ist die Reduktion von NO_2^- zu NO (NirS). Blau dargestellt ist die Reduktion von NO zu N_2O (NorB/C). Der letzte Schritt der Denitrifikation ($N_2O \rightarrow N_2$) wird durch NosZ katalysiert (rot dargestellt). ÄM: Äußere Membran, IM: Innere Membran, Peri.: Periplasma, Cyto.: Cytoplasma.

1.2.3 Regulation des anaeroben Metabolismus in *Pseudomonas aeruginosa*

Die Regulation des anaeroben Metabolismus in *P. aeruginosa* erfolgt durch drei zentrale Regulationselemente: den Sauerstoffsensor Anr (Sawers, 1991), den Stickstoffmonoxidsensor Dnr (Arai *et al.*, 1995 b) und das Zweikomponentensystem NarXL (Schreiber *et al.*, 2007).

Der Sauerstoffsensor Anr:

Anr steht für *anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction* und detektiert Sauerstoff über ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum. Anr leitet damit die anaerobe Regulationskaskade bei sauerstofflimitierenden Umweltbedingungen ein. Der Mechanismus der Sauerstoffdetektion ist dabei analog zu dem des Fnr aus *E. coli*, welches ebenfalls über ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Zentrum verfügt. Fnr steht für *fumarate and nitrate reductase regulator*. Die Aminosäureidentität zwischen Anr und Fnr beträgt ca. 50 % (Körner *et al.*, 2003).

Unter aeroben Bedingungen liegen Anr und Fnr als Monomere vor. Im Gegensatz dazu dimerisieren sie unter anaeroben Bedingungen (Winteler & Haas, 1996) unter Ausbildung der $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster. Durch die dabei erfolgenden Konformationsänderungen kommen die DNA-bindenden Domänen in unmittelbare Nähe zueinander und die Aktivierung von *narK₁K₂GHIJ*, *dnr* und *narX/L* kann erfolgen (Arai *et al.*, 1997 und Schreiber *et al.*, 2007). Die Regulation der anaeroben Fermentation in *P. aeruginosa* wird ebenfalls über Anr reguliert (Eschbach *et al.*, 2004).

Die DNA-Bindung des Anr-Proteins erfolgt hierbei an einem streng konservierten Motiv. Die Erkennungssequenzen des *E. coli* Fnr und des *P. aeruginosa* Anr sind dabei identisch. Münch *et al.* (2005) konnten folgendes, in Abbildung 5 dargestelltes Sequenzmotiv durch vergleichende DNA-Analysen *in silico* mittels der Software „Virtual Footprint“ identifizieren.

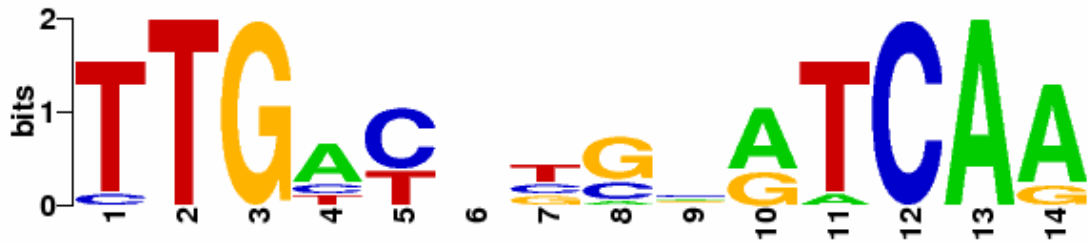


Abbildung 5: Sequenzlogo der *in silico* identifizierten DNA-Binderegion des *P. aeruginosa*-Proteins Anr (nach Münch *et al.*, 2005).

Dargestellt ist das *in silico* identifizierte konservierte Bindemotiv des *P. aeruginosa* Proteins Anr. Die wahrscheinlichste Base wird in jeder Spalte zuoberst dargestellt. T: Thymin, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin.

Der Stickstoffmonoxidsensor Dnr:

Dnr steht für *d*issimilatory *n*itrate *r*espiration *r*egulator. Die Detektion von Stickstoffmonoxid durch Dnr erfolgt wahrscheinlich über eisenhaltiges Häm (Giardina *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Anr/Fnr wurden für Dnr keine Eisen-Schwefel-Zentren detektiert. Interessanterweise ist das DNA-Bindemotiv des Dnr identisch zu dem oben beschriebenen Motiv von Anr/Fnr. Dennoch existieren sowohl Dnr-spezifische Promotoren, wie z.B. die Promotoren der Gene *nirS*, *nirQ*, *norCB* und *nosZ* (Arai *et al.*, 1999 und Arai *et al.*, 2003), als auch Promotoren, die von Dnr und Anr erkannt werden, wie z.B. vor den Genen *narK₁K₂GHIJ* (Schreiber *et al.*, 2007 und Steen, 2011).

Das Zweikomponentensystem NarXL:

Das Zweikomponentensystem NarXL in *P. aeruginosa* besteht aus der Sensorkinase NarX und dem von ihr aktivierten Transkriptionsregulator NarL (Schreiber *et al.*, 2007). Bisher konnten, im Gegensatz zum homologen System in *E. coli*, nur wenige Promotoren identifiziert werden, die sich unter NarL-Kontrolle befinden (Härtig *et al.*, 1999, Krieger *et al.*, 2002, Schreiber *et al.*, 2007 und Vollack *et al.*, 1999).

Abbildung 6 zeigt zusammenfassend die Regulation des anaeroben Metabolismus in *P. aeruginosa*.

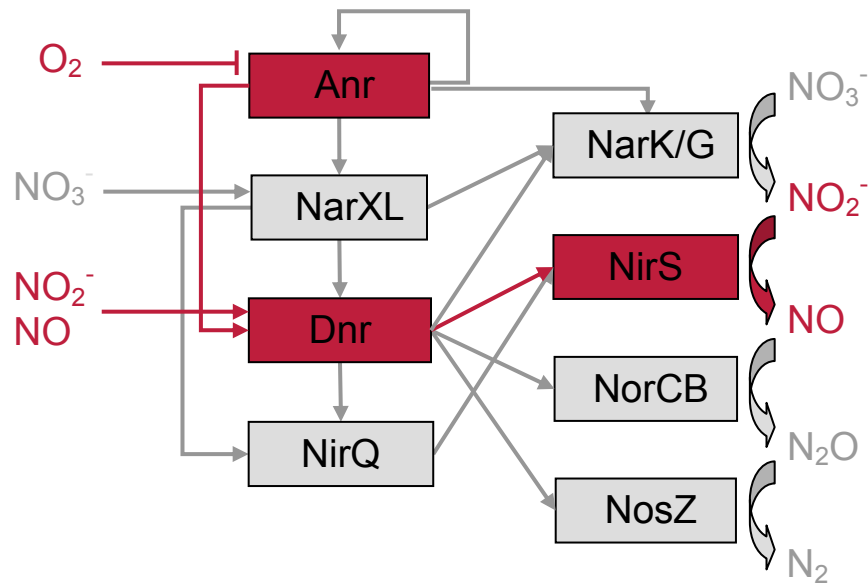


Abbildung 6: Regulation des anaeroben Metabolismus in *P. aeruginosa* (nach Schreiber *et al.*, 2007).
Dargestellt ist die anaerobe Regulationskaskade in *P. aeruginosa*. Links angegeben sind die eigentlichen Aktivator-/Repressormoleküle. Rechts gezeigt ist die von den entsprechenden Enzymen katalysierte Reaktion. Rot eingefärbt ist der Ausschnitt der Regulationskaskade, der für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist. Pfeile: Induktion, T-Pfeile: Repression.

1.3 Das *nir*-Operon in *Pseudomonas aeruginosa*

Das *nir*-Operon in *P. aeruginosa* besteht aus elf aufeinanderfolgenden, zumeist überlappenden Genen: *nirSMCFDLGHJEN*. Bisher wurden die Proteine NirS, NirM, NirC und NirE charakterisiert (Silvestrini *et al.*, 1994, Hasegawa *et al.*, 2001 und Storbeck *et al.*, 2009). Die Funktionen der Proteine NirF, NirD, NirL, NirG, NirH, NirJ und NirN konnten bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Es wurde lediglich gezeigt, dass die Proteine NirF, NirD, NirL, NirG, NirH und NirJ (sowie NirE) an der Biosynthese des spezifischen Tetrapyrrols Häm d_1 beteiligt sind (Kawasaki *et al.*, 1995).

1.3.1 Die Nitritreduktase NirS

Bei NirS handelt es sich um ein Homodimer, welches im Periplasma die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid katalysiert. Jede Untereinheit (je ca. 62,6 kDa) des Enzyms trägt ein kovalent gebundenes Häm c und ein nicht-kovalent gebundenes Häm d_1 (Silvestrini *et al.*, 1994). Demnach wird das Enzym NirS folglich auch als

Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase bezeichnet. Damit unterscheidet sich das Enzym NirS von anderen Nitritreduktasen (NirK), welche Kupfer als Kofaktor besitzen und in manchen Denitrifizierern anstelle von NirS vorkommen (Tavares *et al.*, 2006). Die eigentliche Reduktion von NO₂⁻ zu NO findet am Häm *d*₁-Molekül statt. Der Elektronenfluss verläuft dabei von einem externen Elektronendonator über Häm *c* auf Häm *d*₁ (Hasegawa *et al.*, 2001).

Abbildung 7 zeigt die Röntgenkristallstruktur der Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* (Nurizzo *et al.*, 1997).

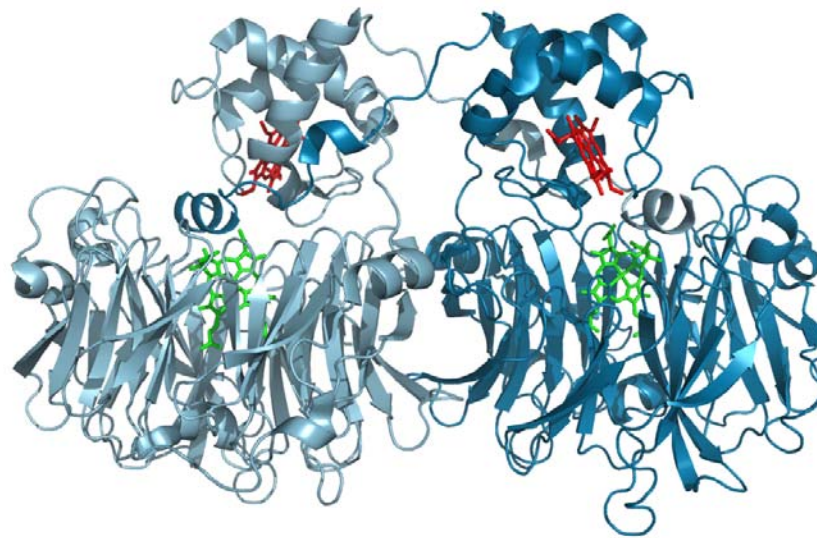


Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur der Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* (Nurizzo *et al.*, 2007).

Deutlich erkennbar sind die beiden Untereinheiten (hellblau bzw. dunkelblau) der homodimeren NirS. α-Helikale Strukturen sind spiralförmig dargestellt, β-Faltblattstränge als Pfeile. Rot eingefärbt ist der Kofaktor Häm *c*, grün der Kofaktor Häm *d*₁. Die Auflösung beträgt 2,15 Å.

Bei den dargestellten Molekülen Häm *c* und Häm *d*₁ handelt es sich um Tetrapyrrole, deren Bedeutung, Struktur und Biosynthese in Kapitel 1.5 detailliert beschrieben sind. So zeigt Abbildung 15 die Strukturformel des Häm *d*₁-Moleküls.

1.3.2 Die Cytochrome NirM und NirC

Das c-typ Cytochrom NirM (ca. 11 kDa) wird auch als Cytochrom *c*₅₅₁ bzw. *c*₈ bezeichnet. NirM dient als Elektronendonator für die Nitritreduktase NirS (Arai *et al.*, 1990). Wie auch NirM, so ist NirC (ca. 13 kDa) periplasmatisch lokalisiert und besitzt ein N-terminales Signalpeptid für den Transport über die Membran. Die

Aminosäuresequenzhomologie zwischen beiden Proteinen beträgt ca. 20 %. Hasegawa *et al.* (2001) konnten zeigen, dass NirC ebenfalls als Elektronendonator für die Nitritreduktase NirS dient. Die Fähigkeit, Elektronen bereitzustellen, ist für NirM, im Vergleich zu NirC, um den Faktor 10 höher. Zu NirM homologe c-type Cytochrome sind zudem in einigen nicht denitrifizierenden Bakterien zu finden. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei NirC um den evolutionär älteren Elektronendonator für die Nitritreduktase NirS handelt und NirM, auf Grund seiner höheren Elektronendonorkapazität, später in das *nir*-Operon integriert wurde. Interessanterweise konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass neben NirM und NirC auch das Kupferprotein Azurin als Elektronendonator für die Nitritreduktase NirS in Frage kommt. Ein physiologischer Zusammenhang konnte bisher jedoch nicht hergestellt werden (Zonnini, 1989).

1.3.3 Die Methyltransferase NirE

Storbeck *et al.* konnten 2009 zeigen, dass es sich bei dem Enzym NirE um ein Homodimer (ca. 30 kDa je Untereinheit) handelt. NirE ist in der Lage, Uroporphyrinogen III zu Precorrin-2 umzuwandeln. Hierbei werden zwei Methylgruppen an die Positionen C2 und C7 des Uroporphyrinogen III addiert. Als Methylgruppendonor dient dabei S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). NirE ist somit eine SAM-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase (SUMT). NirE besitzt eine 47%ige Aminosäuresequenzhomologie zu anderen *P. aeruginosa*-SUMTs, wie z.B. CysG oder CobA, welche in weiteren Tetrapyrrolbiosynthesewegen Methylgruppen auf Uroporphyrinogen III transferieren.

Abbildung 8 zeigt die Röntgenkristallstruktur der *P. aeruginosa*-SUMT NirE (Storbeck *et al.*, 2011)

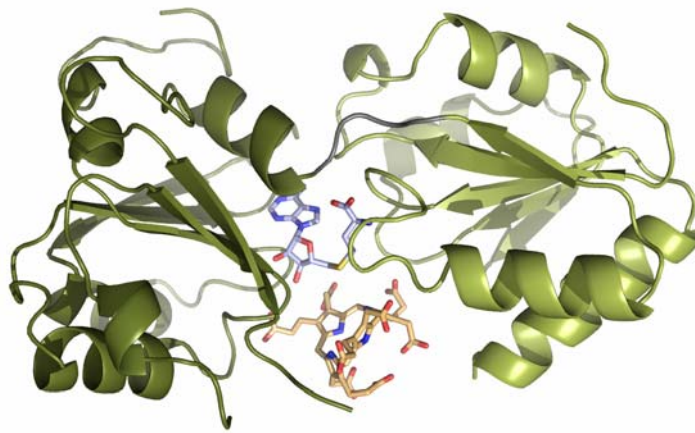


Abbildung 8: Röntgenkristallstruktur der SUMT NirE aus *P. aeruginosa* (Storbeck *et al.*, 2011). Deutlich erkennbar sind die beiden Domänen (hellgrün bzw. dunkelgrün) eines Monomers der homodimeren NirE. α -Helikale Strukturen sind spiralförmig dargestellt, β -Faltblattstränge als Pfeile. Das Substrat Uroporphyrinogen III ist gelb eingefärbt, das Reaktionsnebenprodukt S-Adenosyl-Homocystein blau. Die Auflösung beträgt 2,0 Å.

1.3.4 Hypothetische Funktionen der Proteine NirF, NirDLGH, NirJ und NirN

Wie bereits erwähnt, wurden die Funktionen der Proteine NirF, NirD, NirL, NirG, NirH, NirJ und NirN bisher nicht ausreichend geklärt. Lediglich die Beteiligung der Proteine NirF, NirD, NirL, NirG, NirH, NirJ und NirE an der Biosynthese des spezifischen Tetrapyrrols Häm d_1 konnte gezeigt werden (Kawasaki *et al.*, 1995). Durch bioinformatische Analysen der Aminosäuresequenzen und erste initiale Charakterisierungen können jedoch Arbeitshypothesen zu den Funktionen dieser Proteine aufgestellt werden.

1.3.4.1 NirF

Das Protein NirF (ca. 43 kDa) zeigt 20 % Aminosäuresequenzidentität mit der in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Nitritreduktase NirS. Eine detaillierte biochemische Charakterisierung der NirF aus *P. aeruginosa* ist bisher noch nicht erfolgt. Bioinformatische Analysen ergaben, dass die homologe NirF aus *Paracoccus pantotrophus* eine Sec-abhängige Signalsequenz trägt, die eine Lokalisation der NirF im Periplasma vorhersagte. Bali *et al.* konnten die periplasmatische Lokalisation von NirF aus *P. pantotrophus* 2010 experimentell bestätigen. Im Gegensatz dazu zeigt

das Protein NirF aus *P. aeruginosa* keine eindeutige Signalsequenz für einen Transport ins Periplasma und wird in den Datenbanken als cytoplasmatisches Protein geführt (Winsor *et al.*, 2009). Aktuelle unpublizierte Forschungsergebnisse von Dipl.-Chem. T. Nicke aus unserer Arbeitsgruppe deuten jedoch auf eine Lokalisation von *P. aeruginosa*-NirF im Periplasma hin.

Im Zusammenhang mit der Frage der Lokalisation wird derzeit untersucht, welche biochemische Reaktion NirF katalysiert. Eine mögliche Funktion der NirF besteht in der Katalyse der Reduktion der Seitenkette an Position C17 des Tetrapyrrols Häm d_1 zur Acrylatgruppe und/oder die Einführung der Doppelbindung zwischen den Position C14 und C15. Auf Grund der 20%igen Aminosäuresequenzidentität zu NirS wird postuliert, dass NirF an den späten Schritten der Häm d_1 -Biosynthese beteiligt sein und das fertige Häm d_1 auf NirN übertragen könnte.

1.3.4.2 NirN

Das Protein NirN (ca. 54 kDa) ist ein im Periplasma lokalisiertes, monomeres Cytochrom *c* (Hasegawa *et al.*, 2001). NirN zeigt eine Aminosäuresequenzidentität von 24 % zur Nitritreduktase NirS. Zajicek *et al.* konnten 2009 für die homologe NirN aus *P. pantotrophus* Häm d_1 -Bindung nachweisen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NirN in der Lage ist Häm d_1 auf NirS zu übertragen (Zajicek *et al.*, 2009):

Aktuelle Forschungsergebnisse von Dipl.-Chem. T. Nicke deuten auf eine direkte Interaktion zwischen NirN und NirS hin. Dies unterstützt die These, dass NirN Häm d_1 binden und zu NirS transportieren könnte.

1.3.4.3 NirJ

Das cytoplasmatische Protein NirJ (ca. 44 kDa) besitzt C-terminal das Aminosäuresequenzmotiv CXXXCXXC (Winsor *et al.*, 2009). Dieses Cystein-Motiv deutet auf das Vorhandensein eines Eisen-Schwefel-Zentrums hin und ist zudem sehr charakteristisch für Proteine die zur „Radical-SAM“ Familie gehören (Zumft, 1997 und Sofia *et al.*, 2001). Diese Proteine katalysieren in der Regel chemisch anspruchsvolle Radikalreaktionen unter Verwendung des Kosubstrats *S*-Adenosyl-L-Methionin. Für NirJ wäre beispielweise die Einführung der Oxo-Gruppen an den

Positionen C3 und C8 im Verlauf der Häm d_1 -Biosynthese als zu katalysierende Reaktion denkbar.

Brindley *et al.* zeigten 2010 durch ESR-Untersuchungen erstmals für das homologe Protein NirJ aus *Paracoccus pantotrophus*, dass es ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum enthält und unter reduzierenden Bedingungen in der Lage ist, SAM zu binden. Die katalytische Funktion von NirJ wurde allerdings bisher noch nicht identifiziert.

1.3.4.4 NirD, NirL, NirG und NirH (NirDLGH)

Die Proteine NirD (ca. 17 kDa), NirL (ca. 20 kDa), NirG (ca. 16,5 kDa) und NirH (ca. 19,5 kDa) weisen eine paarweise Homologie (NirD zu NirG 42 % Identität, NirL zu NirH 35 % Identität) zueinander auf (Winsor *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde für diese vier Proteine ein $\alpha\alpha'\beta\beta'$ heterotetramerer Komplex postuliert. Dieser könnte eine symmetrische Reaktion, wie die Decarboxylierung der Acetatseitengruppen an den Positionen C12 und C18 zu Methylgruppen im Verlauf der Häm d_1 -Biosynthese katalysieren (Palmedo *et al.*, 1995). Bisher wurde die tatsächliche Funktion dieser Proteine noch nicht aufgeklärt.

In einigen denitrifizierenden Bakterien, wie z.B. *Dinoroseobacter shibae* oder *Hydrogenobacter thermophilus*, sind die Gene *nirD* und *nirL* fusioniert (*nirDL*). Diese Genfusionen kodieren für ein Fusionsprotein NirDL. Diese Tatsache spricht für eine Interaktion zwischen den Proteinen NirD und NirL bzw. NirG und NirH aus *P. aeruginosa*.

Aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien wurden die Proteine NirDLGH in den Datenbanken als Transkriptionsregulatoren der AsnC/Lrp-Familie annotiert. Der Name dieser Regulatorfamilie leitet sich ab von *leucine-responsive regulatory protein* (Lrp) und *asparagine synthase C* (AsnC) aus *E. coli* (Winsor *et al.*, 2009). Initiale Untersuchungen des NirL Proteins aus *Heliophilum fasciatum* (Xiong *et al.*, 2007) deuten tatsächlich auf eine regulatorische Funktion dieses Proteins hin. Es wurde gezeigt, dass NirL an ein DNA-Fragment bindet, welches 200 bp upstream der *nirJ* Gene in *H. fasciatum* umfasst. Diese Ergebnisse wurden aber nicht durch weitere molekularbiologische Experimente untermauert.

1.4 Die Familie der AsnC/Lrp-Transkriptionsregulatoren

Die Proteine der Familie der AsnC/LRP-Transkriptionsregulatoren regulieren sowohl globale als auch spezifische metabolische Funktionen in Prokaryoten (Brinkman *et al.*, 2000). Die Namensgebung ist dabei in der Literatur nicht eindeutig geklärt und kann missverstanden werden, da dieser Familie auch Proteine zugeordnet werden, die weder den Leucin- noch den Asparaginstoffwechsel regulieren (Yokoyama *et al.*, 2005). Als Synonym für Proteine dieser Familie wird daher ebenfalls *feast/famine regulatory protein* (FFRP) verwendet (Calvo & Matthews, 1994). Gemeinsamkeiten bestehen jedoch in der Tatsache, dass Proteine dieser Familie sowohl in Bakterien als auch in Archäen zu finden sind und sie sowohl transkriptionsaktivierende als auch -reprimierende Wirkung haben (Koike *et al.*, 2003 und Suzuki *et al.*, 2003).

Der bekannteste und als erster charakterisierter Vertreter der Familie der AsnC/Lrp-Transkriptionsregulatoren ist das Genprodukt des *E. coli*-Gens *lrp* (Anderson *et al.*, 1976 und Newman & Lin, 1995). Bis zu 10 % aller Gene in *E. coli* werden durch Lrp reguliert, oftmals unabhängig von dem namensgebenden Leucin. Darunter sind Gene der Aminosäurenbiosynthese und des Aminosäurenabbaus, des Kohlenstoffabbaus, des Stickstoffstoffwechsels, aber auch der Fimbriensynthese und des Sekretionsapparates (Chen *et al.*, 1997). Entscheidend bei allen Lrp-Regulationskaskaden scheint jedoch zu sein, dass es sich um ein Signal handelt, welches den Organismus je nach Umweltbedingungen auf den „Überflusszustand“ bzw. den „Hungerzustand“ (daher der Name *feast/famine*) anpasst (Yokoyama *et al.*, 2005).

Alle Mitglieder der AsnC/Lrp-Transkriptionsregulatorfamilie besitzen ein N-terminales *Helix-Turn-Helix*-Motiv, welches für die DNA-Bindung verantwortlich ist und eine C-terminale Effektorbindedomäne. Im Falle des *E. coli*-Proteins Lrp bindet C-terminal Leucin (Calvo & Matthews, 1994). Die erste Röntgenkristallstruktur eines AsnC/Lrp-Transkriptionsregulators wurde 2001 von Leonard *et al.* gelöst. Dabei handelt es sich um das Lrp-Homolog LrpA aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus*. Interessanterweise konnte in gelpermeationschromatographischen Studien gezeigt werden, dass je nach pH-Wert ein unterschiedlicher Oligomerisierungsgrad von LrpA vorliegt. So wurden dimere, tetramere und oktamere LrpA-Spezies detektiert. Die Kristallstruktur lässt jedoch auf

eine wagenradähnliche oktamere Struktur schließen, welche die DNA „aufwickelt“ und die Initiation der Transkription ermöglicht (Sedelnikova *et al.*, 2001).

Abbildung 9 zeigt die Röntgenkristallstruktur des LrpA aus *P. furiosus*.

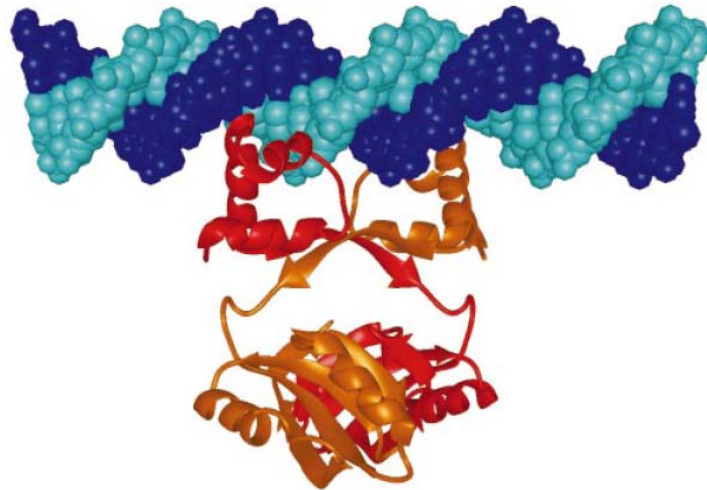


Abbildung 9: Röntgenkristallstruktur des Transkriptionsregulators LrpA aus *Pyrococcus furiosus* mit modellierter DNA-Interaktion (Leonard *et al.*, 2001).

Der dimere Aufbau des Transkriptionsregulators (rot und orange dargestellt) ist deutlich erkennbar. α -Helikale Strukturen sind spiralförmig dargestellt, β -Faltblattstränge als Pfeile. Die Dimerisierung erfolgt im C-terminalen Bereich sowie an dem Linker zwischen N- und C-Terminus der Domänen. Die DANN-Doppelhelix ist blau und türkis eingefärbt. Das *Helix-Turn-Helix*-Motiv des Transkriptionsregulators greift bei der Interaktion in die große Furche der DNA. Die Auflösung beträgt 2,9 Å.

Integration Host Factor :

Die Ausbildung des Initiationskomplexes und die damit verbundene räumliche und strukturelle Veränderung der DNA wird in vielen Fällen durch den *integration host factor* (IHF) unterstützt (Swinger & Rice, 2004). Bei IHF handelt es sich um ein kleines (ca. 10 kDa) basisches Heterodimer aus den Untereinheiten HimA und HimD, welches zur Familie der Histon-ähnlichen Proteine gezählt wird und erstmals bei Untersuchungen der chromosomalen Integration des Phagen λ entdeckt wurde (Nash, 1981 und Friedman, 1998). Mittlerweile sind zahlreiche Funktionen für IHF beschrieben, die nahezu sämtliche zellulären Prozesse betreffen (Freundlich *et al.*, 1992).

1.5 Tetrapyrrole

Wie in Kapitel 1.3.1 erläutert, enthält die Nitritreduktase NirS zwei Kofaktoren: Häm *c* und Häm *d*₁. Beide gehören zu der Molekülklasse der Tetrapyrrole.

1.5.1 Struktur der Tetrapyrrole

Tetrapyrrole bestehen aus vier kovalent verbundenen Pyrrolringen, welche entweder linear oder zirkulär durch Methin- oder Methylenbrücken miteinander verbunden sind. Bei zyklischen Tetrapyrrolen werden die vier Ringe im Uhrzeigersinn beginnend links oben mit A, B, C und D bezeichnet.

Abbildung 10 zeigt die Grundstruktur aller zyklischen Tetrapyrrole, den Porphyrinring.

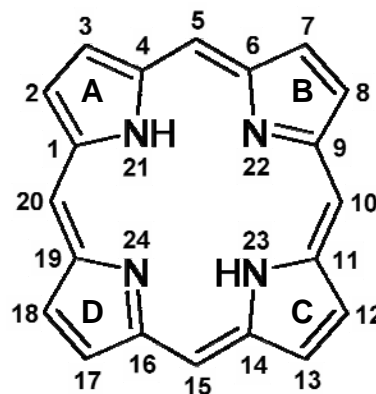


Abbildung 10: Grundstruktur aller zyklischen Tetrapyrrole (Porphyrinring).
Dargestellt ist das Grundgerüst zyklischer Tetrapyrrole. Die Ringnomenklatur wurde mit A, B, C und D markiert. Die Stickstoffatome werden mit den Positionen N21-24 bezeichnet, die Kohlenstoffatome mit C1-20.

In Abbildung 10 erkennt man die für Porphyrine typische vollständige Konjugation der Doppelbindungen des Ringsystems, was zu einem ausgedehnten π -Elektronensystem führt. Tetrapyrrole besitzen die Fähigkeit verschiedene Metallionen zu chelatieren. Beispiele hierfür sind Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} (Smith & Warren, 2009). Weitere Unterschiede zwischen den verschiedenen Tetrapyrrolen bestehen in der Sättigung des Ringsystems (Chlorine, Bakteriochlorine, etc.) und in der Anzahl und Art der Seitenketten (Heinemann *et al.*, 2008 und Layer *et al.*, 2010).

1.5.2 Bedeutung der Tetrapyrrole

Tetrapyrrole werden auch „*Colors of life*“ genannt. Diese Bezeichnung geht auf die Tatsache zurück, dass sie farbig sichtbar in der Natur vorkommen, so z.B. das Häm, welches Blut rot färbt, oder Chlorophyll, welches die Blätter der Pflanzen grün färbt (Milgrom, 2001).

Tetrapyrrole sind entscheidend an vielen essenziellen Vorgängen des Lebens beteiligt, so z.B. die bereits erwähnten Chlorophylle (*a*, *b*, *c*, *d*), welche als Bestandteile der Photorezeptoren während der Photosynthese unabdingbar sind und die Energie des Sonnenlichtes in chemische Energie umwandeln (Jahn *et al.*, 1996). Häm sorgt (als Bestandteil des Hämoglobins oder Myoglobins) für den Sauerstofftransport im Blut und Gewebe, kommt aber auch als Kofaktor in Katalasen, Peroxidasen und Oxidasen vor (Heinemann *et al.*, 1998). Aber auch in der Atmungskette sind Tetrapyrrole an biochemischen Redoxreaktionen beteiligt, so z.B. in Komplex III und IV (Berg *et al.*, 2007). Das Tetrapyrrol Häm *c* ist als Kofaktor in diversen Enzymen vorhanden, demhingegen kommt das Isobakteriochlorin Häm *d₁* nur in der Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase vor. Diese katalysiert die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid (Silvestrini *et al.*, 1994). Das Tetrapyrrol Koenzym F₄₃₀ ist an der Methanbildung in methanogenen Archaea, wie z.B. *Methanosarcina barkeri* beteiligt (Thauer & Bonacker, 1994). Das Molekül Sirohäm ist Kofaktor von diversen Sulfit- und Nitritreduktasen (Murphy *et al.*, 1974).

Seit einigen Jahren werden Tetrapyrrole erfolgreich zu therapeutischen Zwecken in der Medizin im Bereich der photodynamischen Therapie gegen bakterielle Infektionen und Tumore eingesetzt (Bonnet, 1999).

1.5.3 Biosynthese der Tetrapyrrole

Im Nachfolgenden wird die Biosynthese des Tetrapyrrols Uroporphyrinogen III näher erläutert. Des Weiteren wird das Tetrapyrrol Häm *d₁*, welches einen Kofaktor für die Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* darstellt, detailliert beschrieben.

1.5.3.1 Biosynthese von Uroporphyrinogen III

Die Biosynthese der bekannten Tetrapyrrole startet in allen bisher untersuchten Organismen mit der Bildung von 5-Aminolävulinsäure (ALA). Bei den α -Proteobakterien, aber auch bei Säugern und anderen Wirbeltieren, wird dieses über den Shemin-Weg durch die Kondensation von Glycin und Succinyl-CoA synthetisiert (Shemin und Russel, 1953). Ein alternativer Syntheseweg, der C₅-Weg, bei dem ALA aus Glutamat gebildet wird, wurde in den siebziger Jahren entdeckt und ist unter anderem in Grünalgen, wie z. B. *Scenedesmus obliquus*, zu finden (Beale und Castelfranco, 1973, Beale *et al.*, 1975 und Jahn *et al.*, 1992).

Das nächste Intermediat, Porphobilinogen, ergibt sich aus der asymmetrischen Kondensation zweier ALA-Moleküle durch HemB (Frankenberg *et al.*, 1998). Vier Porphobilinogenmoleküle werden anschließend durch die Porphobilinogen-Deaminase HemC zu Pre-Uroporphyrinogen, einem linearen Tetrapyrrol, umgesetzt (Raux *et al.*, 2003). Schließlich erfolgt eine Zyklisierungsreaktion durch HemD unter Inversion des D-Rings zu Uroporphyrinogen III, dem Vorläufer aller weiteren zyklischen Tetrapyrrolverbindungen (Raux *et al.*, 2003). Uroporphyrinogen III stellt damit einen globalen Verzweigungspunkt der Tetrapyrrolbiosynthese dar (nach Smith & Warren, 2009).

Abbildung 11 veranschaulicht die Biosynthese des Uroporphyrinogen III und dessen zentrale Bedeutung in der Tetrapyrrolbiosynthese.

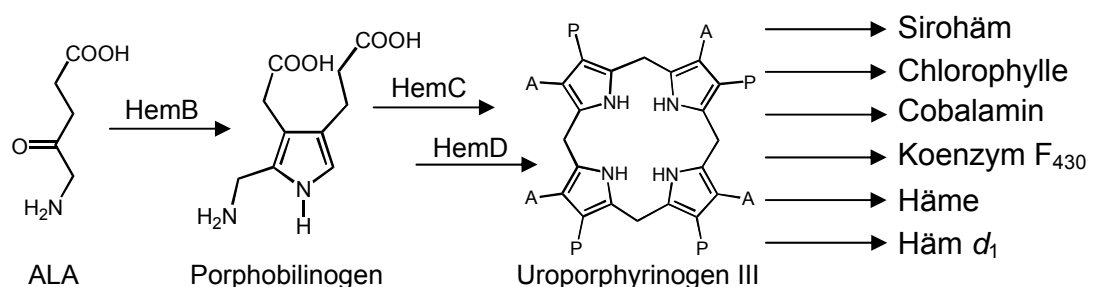


Abbildung 11: Biosynthese des Uroporphyrinogen III.

Deutlich erkennbar wird die zentrale Verzweigung der Tetrapyrrolbiosynthese am Uroporphyrinogen III. A: Acetat-Seitengruppen, P: Propionat-Seitengruppen.

Durch Methylierung des Tetrapyrrols Uroporphyrinogen III zu Precorrin-2 wird die Porphinoid-Synthese eingeleitet. Durch Oxidation des Precorrin-2 zu

Sirohydrochlorin und weitere Reaktionsschritte werden Sirohäm, Koenzym F₄₃₀, Häm *d*₁ und Cobalamin (Vitamin B₁₂) synthetisiert.

Im Gegensatz dazu wird die Synthese von (Bakterio-)Chlorophyllen und Hämen durch die Bildung von Coproporphyrinogen III eingeleitet, welches anschließend durch Decarboxylierung und Oxidation zu Protoporphyrin IX umgesetzt wird. Durch Eiseneinbau in Protoporphyrin IX entsteht Häm. Alternativ dazu führt der Einbau von Magnesium in Protoporphyrin IX weiter zur Biosynthese der (Bakterio-)Chlorophylle (nach Bröcker, 2006).

1.5.3.2 Häm *d*₁

Bei Häm *d*₁ handelt es sich, anders als der Name vermuten lässt, nicht um ein Häm, sondern um ein Isobakteriochlorin. Eine genaue Bezeichnung für Häm *d*₁ lautet 3,8-Dioxo-17-Acrylat-Porphyrindione (Chang, 1985 und Chang *et al.*, 1986). Es besitzt für Tetrapyrrole ungewöhnliche und einzigartige Seitenketten, wie z.B. Oxo-, und Acrylatsubstituenten (Abbildung 12). Im Vergleich zu Porphyrinen ist das zentral chelatierte Eisenion bei diesem Isobakteriochlorin leichter zu oxidieren. Diese Tatsache liegt vermutlich an der Wechselwirkung zwischen den Oxo-Gruppen und dem Ringsystem (Anderson *et al.*, 1990). Die räumliche Gesamtstruktur des Häm *d*₁-Moleküls ist leicht gewölbt, wobei sich das fünffach koordinierte Eisen-(III)-Ion etwas außerhalb der planaren Ebene der vier Stickstoffatome befindet (Barkigia *et al.*, 1992). Die Biosynthese des Häm *d*₁ erfolgt bis zum Uroporphyrinogen III wie bei allen Tetrapyrrolen (Kapitel 1.5.3.1). Danach katalysiert NirE die Addition der Methylgruppen an die Positionen C2 und C7 (vgl. Kapitel 1.3.3). Der weitere Verlauf der Biosynthese des Häm *d*₁ ist noch ungeklärt, wobei vermutet wird, dass die Nir-Proteine an dieser Biosynthese beteiligt sind (Kapitel 1.3).

Da Häm *d*₁ ausschließlich in der Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase vorkommt, stellt sich die Frage, weshalb speziell dieses Tetrapyrrol für die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid benötigt wird. Rinaldo *et al.* konnten 2007 erstmals zeigen, dass neben der starken Affinität des reduzierten Häm *d*₁ zum Substrat Nitrit (Cutruzzolá *et al.*, 2001) eine sehr niedrige Affinität zum Produkt Stickstoffmonoxid vorliegt. Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus (Rinaldo *et al.*, 2011) belegte die Notwendigkeit von Häm *d*₁ für die Nitritreduktase NirS, da für diesen Mechanismus

eine sehr schnelle Diffusion des Stickstoffmonoxids aus der NirS nötig ist. Dies korreliert mit der niedrigen Affinität von Häm d_1 zu Stickstoffmonoxid.

Abbildung 12 zeigt die Struktur von Häm d_1 .

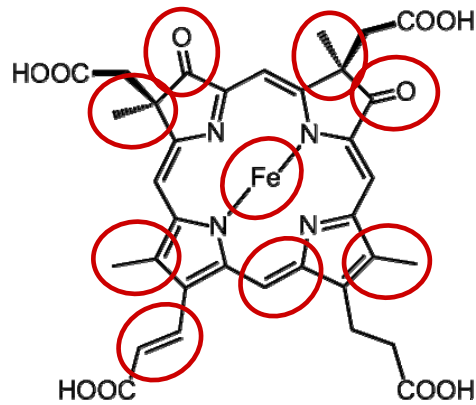


Abbildung 12: Struktur des Tetrapyrrols Häm d_1 .
Rot markiert sind alle strukturellen Veränderungen im Vergleich zum Vorläufermolekül Uroporphyrinogen III. Deutlich erkennbar sind die Oxo-, Methyl- und Acrylatsubstituenten, welche Häm d_1 von herkömmlichen Hämen unterscheiden.

1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, die Proteine NirJ und NirDLGH aus *P. aeruginosa* funktionell zu charakterisieren und deren biologische Bedeutung aufzuklären.

Zuerst sollte das Protein NirJ heterolog produziert und anschließend chromatographisch gereinigt werden. Da es sich um ein hypothetisches Eisen-Schwefel-Protein handelt, sollte der Eisen- und Schwefelgehalt von gereinigtem NirJ bestimmt und das Protein durch UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert werden. Im Anschluss daran sollte ein *in vitro* Aktivitätstest etabliert werden, um die biologische Funktion des Proteins zu untersuchen.

Des Weiteren sollten die Proteine NirDLGH heterolog produziert werden. Durch diverse Expressionssysteme, Ko-Reinigung und Gelpermeationschromatographie sollten die vier Proteine auf Interaktionen untereinander untersucht und deren Oligomerenstatus definiert werden. Anschließend sollte ein *in vitro* Aktivitätstest etabliert werden, um die postulierte katalytische Funktion der Proteine, nämlich die Decarboxylierung von Sirohydrochlorin bzw. Sirohäm, zu bestätigen.

Da durch bioinformatische Analysen eine starke Aminosäuresequenzhomologie zu LRP-Transkriptionsregulatoren gefunden wurde, sollte überprüft werden, ob innerhalb des *nir*-Operons eine weitere Promotorregion existiert, welche durch NirDLGH reguliert wird. Hierzu sollten Aktivitätsanalysen von Promotor-Reporterfusionen und Primer-Extension-Analysen durchgeführt werden. Die Proteine NirDLGH sollten mittels Gelretardationsanalysen auf ihre Fähigkeit, DNA zu binden, hin untersucht werden. Des Weiteren sollte durch DNA-Footprint-Analysen und Gelretardationsanalysen mit verkürzten und mutierten DNA-Fragmenten eine exakte Lokalisierung der DNA-Binderegion durchgeführt werden.

Zuletzt sollten die Proteine NirDLGH kristallisiert werden, um deren Struktur aufzuklären und um daraus weitere Informationen über deren biochemische Eigenschaften abzuleiten.

2. Materialien und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Tabelle 1: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Agagel	Biometra
Anaerobenwerkbank	MACS-MG-1000 anaerobic workstation	DW scientific
Anaerobenarbeitsplatz	Type B flexible vinyl chamber	Coy Laboratories
Autoklav	LVSA 50/70 LVSA	Zirbus
Blotapparatur	TransBlot SD Semidry Transfer Cell	Biorad
Entgasungsanlage	Vakuumpumpe	Vacuubrand
Filtrationsanlage	Vakuumpumpe	Vacuubrand
FPLC	Äkta purifier	Amersham Biosciences
FPLC-Säule	10/300 Superdex 75	GE Healthcare
	16/60 Superdex 200	GE Healthcare
Fluoreszenzspektrometer	L550B	Perkin Elmer
Footprint Gelapparatur	Modell S2	Biometra
French Press	French Pressure Cell Press	Polytec
French Press Zelle	French Pressure Cell	SLM Aminco
Gefrierschrank	VIP Series -86 °C	Sanyo
Geldokumentationsanlage	DeVision DBox	Decon Science Tec
HPLC	Pumpe PU-2080 Plus	Jasco
	Mischer LG-2080-04	Jasco
	Entgaser DG-2080-04	Jasco

	Autosampler AS-2080 Plus	Jasco
	Multiwellenlängendetektor	Jasco
	MD-2015 Plus	
	Fluoreszenzdetektor 2020 Plus	Jasco
HPLC-Säule	Reposil Pur C ₁₈ RP-AQ	Dr. Maisch
	5 µm, 150 x 2,1 mm	
Magnetrührer	KM02 basic	IKA Werke
Nanodrop	ND1000	Peqlab Biotechnology GmbH
pH-Messgerät	CG842	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia
	V-650	Jasco
Pipetten	0,5-10 µl Reference	Eppendorf
	2-20 µl Reference	Eppendorf
	10-100 µl Reference	Eppendorf
	100-1000 µl Reference	Eppendorf
	LAB-Mate 10 ml	ABI Med
Power Supply	PowerPac300	Biorad
Reinstwasseranlage	Milli-Q Synthesis A 10	Millipore
Röntgenfilmentwickler	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte
Schüttler	3020	GFL
	TR-150	Infors AG
SDS-PAGE-Kammer	Mini Protean III	Biorad
	Mini Protean Tetracell	Biorad
Speed Vac®	SPD101B	Savant
Thermocycler	MyCycler	Biorad
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
	Thermostat Plus	Eppendorf
	Thermostat Comfort	Eppendorf
Ultraschallbad	Eurolab	Merck
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene
Vortex	REAX2000	Heidolph

Waagen	BP61S	Sartorius
	BL1500	Sartorius
	SBA52	Scaltec
Zentrifugen	MiniSpin	Eppendorf
	Centrifuge 5804	Eppendorf
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
	L-90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme.

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme.

Chemikalie/Enzym	Hersteller
2 % Dimethyldichlorsilan „PlusOne Repel-Silan ES“	Amersham Bioscience
Acetonitril, HPLC Grade	Fisher Scientific
Anti-Digoxigenin-AP, F _{ab} Fragmente aus dem Schaf	Roche Applied Science
CDP Star	Roche Applied Science
Chloroform, HPLC Grade	Fisher Scientific
DnaseI-RNase frei	Roche Applied Science
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	Fermentas
Eisen-Standard für AAS	Fluka
EZ AmpliSize Molecular Ruler	Biorad
FS-Puffer	Invitrogen
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Kit for Molecular Weights 12.000-200.000, For GPC	Sigma-Aldrich
Methanol, HPLC Grade	Fisher Scientific
N-Lauroylsarcosine Natriumsalz, HPLC Grade	Fluka
ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid)	AppliChem
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Ponceau S	Genaxxon
Proteinase K	QiaGen

Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Quick-Load 100 bp DNA ladder	New England Biolabs
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Restriktionsenzyme (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i> , <i>SacI</i> , <i>NotI</i> , <i>HindIII</i>)	New England Biolabs
Rhinohide Polyacrylamide Gel Strengtheners	Invitrogen
RNase-freies Wasser	Roth
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Roth
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	USB

Weitere verwendete, hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen GE Healthcare, Fluka, Merck, Riedel de Haën, Roche, Sigma und Serva mit dem Reinheitsgrad *p.a.* bezogen.

2.1.3 Hilfsmittel

Tabelle 3 stellt die in dieser Arbeit verwendeten Hilfsmittel dar.

Tabelle 3: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Hilfsmittel.

Hilfsmittel	Hersteller
Affinitätsmaterial „Ni ²⁺ Chelating Sepharose Fast Flow“	GE Healthcare
Blotmembran „Roti-PVDF Transfer Membran“	Millipore
Blotmembran „Nytran N“	Whatman
Blotpapier neoLab	neoLab [®]
CL-X Posure Film	Pierce
Entsalzungssäulen PD 10	Amersham Pharmacia
Filtrationseinheit „Filtropur BT50“ (Ø 0,2 µm)	Sarstedt
Konzentrator VivaSpin 15	Sartorius Stedim
Leersäule „Poly-Prep-Column“	Biorad
Micro Bio-Spin Chromatography Columns	Biorad
Mini-Protean TBE Precast Gels, 4-20 %, 15-well comb	Biorad

NAP-25 Säulen	GE Healthcare
QIAquick Spin Miniprep Kit	QiaGen
QIAquick PCR Purification Kit	QiaGen
QIAquick GelExtraction Kit	Qia Gen
RNeasy Plus Mini Kit	Qia Gen
Sterilfilter aus Nitrocellulose (Ø 0,2 µm)	Millipore
Whatmanpapier 3MM	Whatman

2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 4 zeigt die verwendeten *E. coli*- und *P. aeruginosa*-Stämme.

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> Stämme		
BL21 (DE3)-RIL	<i>B F⁻ ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r</i>	Stratagene
DH10B	<i>galλ (DE3) endA Hte</i>	Invitrogen
	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	
	<i>Φ80lacZAM15 ΔlacX74 recA1</i>	Thoma & Schobert, 2009
	<i>endA1 araΔ139 Δ(ara- leu)7697</i>	
	<i>galU galK λ⁻ rpsL (Str^r) nupG</i>	
ST18	<i>pro thi hsdR⁺ Tp^r Sm^r;</i> <i>chromosome::RP4-2 Tc::Mu-</i> <i>Kan::Tn7/λpir ΔhemA</i>	
<i>P. aeruginosa</i> Stämme		
PAO1	Wildtyp	Dunn & Holloway, 1971
PAO1-pJW0	PAO1 <i>attB::(mini-CTX-lacZ)</i>	Diese Arbeit
PAO1-pJW1	PAO1 <i>attB::(pJW1)</i>	Diese Arbeit
PAO1-pJW2	PAO1 <i>attB::(pJW2)</i>	Diese Arbeit
PAO1-pJW3	PAO1 <i>attB::(pJW3)</i>	Diese Arbeit

PAO1-pJW4	PAO1 <i>attB</i> ::(pJW4)	Diese Arbeit
PAO1-pJW5	PAO1 <i>attB</i> ::(pJW5)	Diese Arbeit
PAO1 Δ <i>nirD</i> ID 51332	Tn5 derivative insertion in the <i>nirD</i> gene locus, Tet ^R	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1 Δ <i>nirD</i> ID51332-pJW4	PAO1 Δ <i>nirD</i> ID 51332 <i>attB</i> ::(pJW4), Tet ^R	Diese Arbeit
PAO1 Δ <i>nirD</i> ID 38093	Tn5 derivative insertion in the <i>nirD</i> gene locus, Tet ^R	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1 Δ <i>nirD</i> -ID38093-pJW4	PAO1 Δ <i>nirD</i> ID 38093 <i>attB</i> ::(pJW4), Tet ^R	Diese Arbeit
PAO1 Δ <i>nirL</i> ID 47325	Tn5 derivative insertion in the <i>nirL</i> gene locus, Tet ^R	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1 Δ <i>nirL</i> -ID47325-pJW4	PAO1 Δ <i>nirL</i> ID 47325 <i>attB</i> ::(pJW4), Tet ^R	Diese Arbeit
PAO1 Δ <i>nirG</i> ID 14212	Tn5 derivative insertion in the <i>nirG</i> gene locus, Tet ^R	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1 Δ <i>nirG</i> -ID14212-pJW4	PAO1 Δ <i>nirG</i> ID 14212 <i>attB</i> ::(pJW4), Tet ^R	Diese Arbeit
PAO1 Δ <i>nirH</i> ID 52954	Tn5 derivative insertion in the <i>nirH</i> gene locus, Tet ^R	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1 Δ <i>nirH</i> -ID52954-pJW4	PAO1 Δ <i>nirH</i> ID 52954 <i>attB</i> ::(pJW4), Tet ^R	Diese Arbeit
PAO1 Δ <i>IHF</i>	PAO1, Δ <i>himA</i> , Δ <i>him</i> , chromosomaler Knockout	Steen, 2011

2.2.2 Plasmide

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet. Soweit nicht anders beschrieben, war der Ausgangsorganismus für alle Klonierungen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Tabelle 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Quelle
mini-CTX- <i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> Reportergenfusion, Tet ^R	Becher & Schweizer, 2000
pACYCDuet-1	T7 Expressionsvektor, Cm ^R	Novagen
pACYC- <i>nirDLGH</i>	pACYCDuet-1, His ₆ - <i>nirDLGH</i> , kloniert in <i>EcoRI/HindIII</i> , Cm ^R	Diese Arbeit
pBCM- <i>cysG6</i>	pACYC/pBAD, <i>CysG</i> (<i>Salmonella typhimurium</i>), Cm ^R	Schnell <i>et al.</i> , 2005
pETDuet-1	T7 Expressionvektor, Amp ^R	Novagen
pETDuet-1- <i>cysG</i>	pACYCDuet-1, His ₆ - <i>CysG</i> (<i>E. coli</i>), kloniert in <i>SacI/NotI</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pET- <i>nirA</i>	pMOSBlue, His ₆ - <i>NirA</i> (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>), kloniert in <i>HindIII/NotI</i> , Kan ^R	Schnell <i>et al.</i> , 2005
pET14b- <i>nirL</i>	pET14b, His ₆ - <i>nirL</i> (<i>P. aeruginosa</i>), Amp ^R	AG Warren, nicht publiziert
pET14b- <i>nirG</i>	pET14b, His ₆ - <i>nirG</i> (<i>P. aeruginosa</i>), Amp ^R	AG Warren, nicht publiziert
pET14b- <i>nirH</i>	pET14b, His ₆ - <i>nirH</i> (<i>P. aeruginosa</i>), Amp ^R	AG Warren, nicht publiziert
pET14b- <i>nirJ</i>	pET14b, His ₆ - <i>nirJ</i> (<i>P. aeruginosa</i>), Amp ^R	AG Warren, nicht publiziert
pET32a- <i>nirJ</i>	pET32a, His ₆ - <i>nirJ</i> -Trx (<i>H. thermophilus</i>), Amp ^R	Diese Arbeit
pFLP2	Ausgangsvektor der FLP Rekombinase, Amp ^R	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pHAP1	pUC18 Derivat, beinhaltet ein 9 kb <i>PstI</i> - <i>PstI</i> chromosomales DNA Fragment aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Amp ^R	Arai <i>et al.</i> , 1990
pHAE2	Charomid 9-36 Derivat, beinhaltet ein 9 kb <i>EcoRI-HindIII</i> chromosomales DNA Fragment aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Amp ^R	Kawasaki <i>et al.</i> , 1997

pJM1	pACYCDuet-1, His ₆ - <i>nirD</i> , kloniert in <i>EcoRI/HindIII</i> , Cm ^R	Diese Arbeit
pJM2	pACYCDuet-1, His ₆ - <i>nirD</i> , kloniert in <i>EcoRI/HindIII</i> , <i>nirL</i> in <i>NdeI/XhoI</i> , Cm ^R	Diese Arbeit
pJM3	pETDuet-1, His ₆ - <i>nirH</i> , kloniert in <i>EcoRI/HindIII</i> , <i>nirG</i> in <i>BglII/XhoI</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pJW0	mini-CTX- <i>lacZ</i> , Gentamicin Kasette kloniert in <i>PshAI</i> , Gm ^R	Diese Arbeit
pJW1	mini-CTX- <i>lacZ</i> , 463 bp Fragment upstream <i>nirJEN</i> , kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW2	mini-CTX- <i>lacZ</i> , 363 bp Fragment upstream <i>nirJEN</i> , kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW3	mini-CTX- <i>lacZ</i> , 266 bp Fragment upstream <i>nirJEN</i> , kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW4	pJW0, 166 bp Fragment upstream <i>nirJEN</i> , kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Gm ^R	Diese Arbeit
pJW5	pJW0, 66 bp Fragment upstream <i>nirJEN</i> , kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Gm ^R	Diese Arbeit
pJW6	mini-CTX- <i>lacZ</i> , oJW35, kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW7	mini-CTX- <i>lacZ</i> , oJW30 und oJW33, kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW8	mini-CTX- <i>lacZ</i> , oJW31 und oJW33, kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW9	mini-CTX- <i>lacZ</i> , oJW30 und oJW32, kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW10	mini-CTX- <i>lacZ</i> , oJW34, kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit
pJW11	mini-CTX- <i>lacZ</i> , oJW31 und oJW32, kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R	Diese Arbeit

pRK-ISC	kloniert in <i>EcoRI/XhoI</i> , Tet ^R Isc-Gencluster, baut FeS-Cluster in Proteine ein. ORF1-ORF2-iscS-iscU- iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3, Tet ^R	Takahashi & Nakamura, 1999
pPS858	Ausgangsvektor der Gentamicin- kassette, Amp ^R , Gm ^R	Hoang <i>et al.</i> , 1998

2.2.3 Oligonukleotide

In Tabelle 6 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Name	Oligonukleotid	Verwendungszweck
oJW1	DIG-GTTCCTCCTTCTGCGCCAGG	Primer-Extension-Analyse
oJW2	DIG-CACTCGAGGTCGCCGACGAACG	DNaseI-Protektionsanalyse
oJW3	DIG-GGAATTCGGACGTTCTCCTTCTG	DNaseI-Protektionsanalyse
oJW4-Fw	CACGGCCGCAGCGAAGCGGAGATCGAAGG CTATCGCCAGCAGATCCGCCTGCTGCTCGG CGAGGACTGTCGCGCCGACGA	Gelretardationsanalyse
oJW4-Bw	TCGTCGGCGCGACAGTCCTCGCCGAGCAGC AGGCGGATCTGCTGGCGATAGCCTTCGATC TCCGCTTCGCTGCGGCCGTG	Gelretardationsanalyse
oJW5-Fw	GCGGAGATCGAAGGCTATCGCCAGCAGAT CCGCCTGCTGCTCGGCGAGGACTGTCGCGC CGACGA	Gelretardationsanalyse
oJW5-Bw	TCGTCGGCGCGACAGTCCTCGCCGAGCAGC AGGCGGATCTGCTGGCGATAGCCTTCGATC TCCGC	Gelretardationsanalyse
oJW6-Fw	AGATCCGCCTGCTGCTCGGCGAGGACTGTC GCGCCGACGA	Gelretardationsanalyse
oJW6-Bw	TCGTCGGCGCGACAGTCCTCGCCGAGCAGC AGGCGGATCT	Gelretardationsanalyse
oJW7-Fw	GAGGACTGTCGCGCCGACGAG	Gelretardationsanalyse
oJW7-Bw	CTCGTCGGCGCGACAGTCCTC	Gelretardationsanalyse
oJW8-Fw	CTGCTGCTCGGCGAGGACTGTCGCGCCGAC GA	Gelretardationsanalyse
oJW8-Bw	TCGTCGGCGCGACAGTCCTCGCCGAGCAGC AG	Gelretardationsanalyse

oJW9-Fw	CCTGGCGCAGAAGGAGGAACG	Gelretardationsanalyse
oJW9-Bw	CGTTCCTCCTTCTGCGCCAGG	Gelretardationsanalyse
oJW10-Fw	ACGAACGCATCGAACGCCTCGGCCGGCT	Gelretardationsanalyse
oJW10-Bw	AGCCGGCCGAGGCGTTCGATGCGTTCGT	Gelretardationsanalyse
oJW11-Fw	GCGGAGATCGAAGGCTATCGCCAGCAG	Gelretardationsanalyse
oJW11-Bw	CTGCTGGCGATAGCCTTCGATCTCCGC	Gelretardationsanalyse
oJW12	GACTTGACGATAGTCCTCGCCCGCTACCAG	Klonierung pJW0
oJW13	GACTTGACGATAGTCGACCAGCGGCAGGC C	Klonierung pJW0
oJW14	CCTCGAGTGATCGAACTGACCCAG	Klonierung pJW1
oJW15	CACTCGAGGTCGCCGACGAACG	Klonierung pJW2
oJW16	CACTCGAGGTCGCCGACGAACG	Klonierung pJW3
oJW17	CACTCGAGACAACCTGTTCGCCATG	Klonierung pJW4
oJW18	CACTCGAGGATGCTGGTGAGCAGC	Klonierung pJW5
oJW19	GGAATTCGGACGTTCTCTCTCTG	Klonierung pJW1,2,3,4,5
oJW20	CGGAGCTCGGTGGATCATTTGCC	Klonierung pETDuet-1- CysG
oJW21	AGCGGCCGCTTAATGGTTGGAGAAC	Klonierung pETDuet-1- CysG
oJW22	GATCGAATTCAATGGACGACCTCTCC	Klonierung pJM1,2
oJW23	TATTCTCGAGTCAGAGGGGGAAATGCAG	Klonierung pJM1,3
oJW24	GATCAAGCTTTCAGCATGGACGTTT	Klonierung pJM2
oJW25	GATACATATGAACCCCGTCGAACCCCTC	Klonierung pJM2
oJW26	GATACTCGAGTCATCCATGGCGGCG	Klonierung pJM2
oJW27	TATAGAATTTCGATGTCGGCCTGCATTTCC	Klonierung pJM3
oJW28	TATTAAGCTTTCAGCATGGACGTTCTCC	Klonierung pJM3
oJW29	TATAAGATCTGGATGAGTTCGACCGGC	Klonierung pJM3
oJW30-Fw	TCGAGAGTGGCGCTACAACCTGTTCGCCAT GGTTCACGGCCGAGCGAAGCGGAGATCG AAGGCTATCGCCAGCA	Klonierung pJW7,9
oJW30-Bw	GCGATAGCCTTCGATCTCCGCTTCGCTGCG GCCGTGAACCATGGCGAACAGGTTGTAGC GCCACTC	Klonierung pJW7,9
oJW31-Fw	TCGAGAGTGGCGCTAACCAAGTGTGCCAT GGTTCACGGCCGAGCGAAGCGGAGATCG AAGGCTATCGCCAGCA	Klonierung pJW8,11
oJW31-Bw	GCGATAGCCTTCGATCTCCGCTTCGCTGCG GCCGTGAACCATGGCGAACTTGGTTAGCG CCACTC	Klonierung pJW8,11

oJW32-Fw	ATCCGCCTGCTGCTCGGCGAGGACTGTCGC GCCGACGAGATGCTGGTGAGCAGCCGCAT CCTGAAGAAGAG	Klonierung pJW9,11
oJW32-Bw	AATTCTCTTCTTCAGGATGCGGCTGCTCAC CAGCATCTCGTCGGCGCGACAGTCCCGCC GAGCAGCAGGCGGATTGCTG	Klonierung pJW9,11
oJW33-Fw	ATCCGCCTGCTGCGTGGCAGGACTGTCGC GCCGACGAGATGCTGGTGAGCAGCCGCAT CCTGAAGAAGAG	Klonierung pJW7,8
oJW33-Bw	AATTCTCTTCTTCAGGATGCGGCTGCTCAC CAGCATCTCGTCGGCGCGACAGTCCGTGCC ACGCAGCAGGCGGATTGCTG	Klonierung pJW7,8
oJW34-Fw	TCGAGATCCGCCTGCTGCTCGGCGAGGACT GTCGCGCCGACGAGATGCTGGTGAGCAGC CGCATCCTGAAGAAGAG	Klonierung pJW10
oJW34-Bw	AATTCTCTTCTTCAGGATGCGGCTGCTCAC CAGCATCTCGTCGGCGCGACAGTCCCGCC GAGCAGCAGGCGGATC	Klonierung pJW10
oJW35-Fw	TCGAGATCCGCCTGCTGCGTGGCAGGACT GTCGCGCCGACGAGATGCTGGTGAGCAGC CGCATCCTGAAGAAGAG	Klonierung pJW6
oJW35-Bw	AATTCTCTTCTTCAGGATGCGGCTGCTCAC CAGCATCTCGTCGGCGCGACAGTCCGTGCC ACGCAGCAGGCGGATC	Klonierung pJW6

2.3 Medien und Medienzusätze

2.3.1 Medien

In Tabelle 7 sind die verwendeten Medien aufgelistet. Alle Angaben beziehen sich auf ein Endvolumen von 1 Liter. Als Lösungsmittel wurde, sofern nicht anders angegeben, dH₂O verwendet.

Tabelle 7: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Medien.

Name	Bestandteil	Menge
LB-Medium	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g

Zur Herstellung von Festmedien wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar-Agar hinzugegeben.

2.3.2 Medienzusätze

Antibiotika wurden als Stammlösung angesetzt und sterilfiltriert bei -20 °C aufbewahrt. Nach Abkühlen des Mediums auf 45 °C wurden diese hinzugegeben. In

Tabelle 8 sind die verwendeten Medienzusätze aufgelistet. IPTG und Arabinose wurden zur Induktion der Proteinproduktion bei Erreichen definierter Zelldichten hinzugegeben.

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml im Medium
Carbenicillin	250 mg/ml in dH ₂ O	250 µg/ml im Medium
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH	34 – 80 µg/ml im Medium
Eisen-III-Citrat	1 M in dH ₂ O	1 mM im Medium
Gentamycin	80 mg/ml in dH ₂ O	10 – 80 µg/ml im Medium
IPTG	1 M in dH ₂ O	50-1000 µM im Medium
L-(+)-Arabinose	20 % (w/v) in dH ₂ O	0,01 % im Medium
Kanamycin	25 mg/ml in EtOH	25 µg/ml im Medium
D-(+)-Saccharose	50 % (w/v) in dH ₂ O	5 % im Medium
Tetracyclin	15 mg/ml in 50% EtOH	7,5 – 80 µg/ml im Medium

2.4 Mikrobiologische Arbeitstechniken

2.4.1 Sterilisation

Alle verwendeten Substanzen, Medien, Puffer, Glas- und Kunststoffgefäße wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar im Autoklaven dampfsterilisiert. Abzutötende Kulturen wurden separat unter gleichen Bedingungen autoklaviert. Temperaturempfindliche Substanzen wie Antibiotika sowie Spurenelement- und Zuckerlösungen wurden durch einen Filter mit Porendurchmesser von 0,2 µm sterilfiltriert.

2.4.2 Bakterienkultivierung

Für die Kultivierung von Bakterien wurden nur sterile Medien, Lösungen und Gefäße benutzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen.

Kultivierungen auf Festmedien:

Aus einer -80 °C-Glycerinkultur oder von einer bestehenden Festmedienkultur wurden mit einer ausgeglühten Impföse Bakterien entnommen und auf eine LB-Agar-Platte nach der 13-Strich-Methode ausgestrichen. Bei Bedarf enthielten die Platten geeignete Antibiotika und/oder weitere Medienzusätze.

Inokulierte LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

Flüssigkulturen von Bakterien:

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer LB-Platte Einzelkolonien oder aus einer Glycerinkultur Zellen entnommen und in das jeweilige Nährmedium gegeben, welches nach Bedarf entsprechende Antibiotika- und/oder weitere Medienzusätze enthielt. Die Inkubation erfolgte dunkel bei 37 °C und 180-200 rpm auf einem Schüttler.

Vorkulturen wurden in Kulturröhrchen mit 8 ml LB-Medium oder in Schikanekolben mit 50 ml LB-Medium ü. N. bei 37 °C und 180-200 rpm im Schüttler inkubiert.

Hauptkulturen wurden im Verhältnis 1:100 mit Vorkulturen inokuliert.

Anaerobe Kultivierungen wurden in mit Butylsepten verschlossenen Kultivierungsgefäßen bei 37 °C und 130 rpm im Schüttler inkubiert.

2.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte von Bakteriensuspensionen wurde eine Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) im UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia/GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt. Eine OD_{578} von 1 entspricht in etwa einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml Kultur.

2.4.4 Lagerung von Bakterien

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien bei -80 °C wurden 20%ige Glycerinkulturen (v/v) hergestellt. Hierzu wurden 1,2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur mit 400 µl steriler 80 %iger Glycerinlösung (v/v) versetzt, gründlich vermischt und bei -80 °C eingefroren.

Eine kurzfristige Lagerung der Bakterien erfolgte auf mit Parafilm verschlossenen Festmedien bei 4 °C.

2.5 Molekularbiologische Techniken

2.5.1 Herstellung und Transformation von chemokompetenten *E. coli* Zellen durch Calciumchlorid

Für die Herstellung von CaCl_2 -kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 100 ml LB-Medium aus einer Vorkultur im Verhältnis 1:100 inokuliert. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{578} von 0,5 inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (10 min, 2.900 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 10 ml kaltem 0,1 M CaCl_2 / 10 % (w/v) Glycerin suspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 2.900 x g, 4 °C) wurde das Sediment in 1 ml kaltem 0,1 M CaCl_2 / 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde 1 µg Plasmid-DNA vorgelegt und mit 50 µl chemokompetenten Zellen gemischt. Dieser Ansatz wurde 20 min auf Eis gelagert und nach 45 s Inkubation bei 42 °C erneut 2 min auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden 250 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 300 rpm und 37 °C im Thermomixer inkubiert. Jeweils 2, 20 und 200 µl wurden auf entsprechende Antibiotika enthaltene LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert. Aus positiven Transformanten wurden Flüssigkulturen nach Kapitel 2.4.3 beimpft und anschließend Glycerinkulturen nach Kapitel 2.4.4 hergestellt.

2.5.2 Präparation von Plasmid-DNA

Alle Plasmidpräparationen erfolgten mit dem QIAquick Spin Miniprep Kit (QiaGen, Hilden, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.5.3 Bestimmung von DNA -Konzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung erfolgte mittels eines Nanodrop ND1000 Spektrometers (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht hierbei ca. 50 µg/ml ds-DNA.

Der Reinheitsgrad der DNA wurde durch zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Dabei sollte bei einer nahezu proteinfreien DNA-Lösung der Quotient aus OD_{260 nm}/OD_{280 nm} zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.5.4 Trennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Probenpuffer versetzt und anschließend in Agarosegelen (0,7 - 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer, 7,0 cm x 8,2 cm x 0,7 cm) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 75 V, 120 mA und 45 min Laufdauer durchgeführt. Als Größenvergleich diente der DNA-Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland).

Zur Detektion der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese für 20–30 min in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert und unter UV-Belichtung dokumentiert.

Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese

TAE Puffer	TRIS-Acetat, pH 8.0	40 mM
	EDTA	1 mM
Probenpuffer 6x	Xylen Cyanol FF	450 µM
	Orange G	0,25 % (w/v)
	Saccharose	115 mM

2.5.5 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Um Gene oder DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurden Polymerasekettenreaktionen (PCRs) durchgeführt. Als Templat diente, soweit nicht anders beschrieben, 10 ng Plasmid-DNA (pHAP1, pHAE2). Die Primer (Endkonzentration 0,5 µM) wurden so konzipiert, dass sie neben einem 12-18 Basen langen komplementären Teil zum Templat eine Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym besaßen sowie einen 2-3 Basen langen 5'-Überhang. Des

Weiteren enthielt ein PCR-Ansatz 200 μM je dNTP. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 20 μl . Als DNA Polymerase dienten die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) oder die Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) mit den entsprechenden Puffersystemen der Hersteller.

Zuerst wurde die DNA 5 min bei 95–98 °C denaturiert. Im Anschluss erfolgten 30 Zyklen Denaturierung (95 – 98 °C, 15 Sekunden), Primeranlagerung (60 – 72 °C, 30 Sekunden) und Elongation (72 °C). Die Elongationszeit war abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA (30-60 Sekunden pro kb). Nach einer finalen Elongation (72 °C, 10 Minuten) wurden die Proben bei 8 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zusammenfassend sah das Standardprogramm des Thermocycler MyCycle (Biorad, München, Deutschland) wie folgt aus:

	Initiale Denaturierung	95 – 98 °C	5 Minuten
30 x	Denaturierung	95 – 98 °C	15 Sekunden
	Anlagerung der Primer	60 – 72 °C	30 Sekunden
	Elongation	72 °C	30-60 Sekunden pro kb
	Finale Elongation	72 °C	10 Minuten

Anschließend wurden die Amplifikate nach Kapitel 2.5.4 analysiert. Sofern nur das erwünschte Amplifikat erhalten wurde, wurde die Probe mittels QIAquick PCR Purification Kit (QiaGen, Hilden, Germany) gereinigt. Traten weitere Amplifikate auf, so wurde das gewünschte Amplifikat mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QiaGen, Hilden, Germany) isoliert.

2.5.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Das Schneiden von DNA (Vektoren und PCR-Amplifikate) erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Ipswich, USA). Der Erfolg des Verdaus wurde nach Kapitel 2.5.4 analysiert. Geschnittene Fragmente wurden mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QiaGen, Hilden, Germany) gereinigt und für die Ligation verwendet.

2.5.7 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA erfolgte mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor zu Insert) eingesetzt. 3 µl dieses Ansatzes wurden für die Transformation verwendet (vgl. Kapitel 2.5.1)

2.5.8 Sequenzierung

Wurde das Vorhandensein eines Inserts in den erzeugten Vektor-Konstrukten durch Restriktionsanalyse nach Kapitel 2.5.6 bestätigt, so wurde das Konstrukt sequenziert, um Fehler bei der PCR-Amplifikation auszuschließen. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland). Die Auswertung wurde mit dem Programm SeqMan Pro (DNA Star Lasergene, Madison, USA) vorgenommen.

2.5.9 β -Galaktosidaseaktivitätsanalysen

Das Enzym β -Galaktosidase, kodiert durch das Gen *lacZ*, ist in der Lage, das chromogene Substrat o-Nitrophenol-p-D-Galactosid (ONPG) zu spalten. Hierbei entsteht Nitrophenol, dessen Gelbfärbung photometrisch vermessen werden kann (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia/GE Healthcare, München, Deutschland) und mit der β -Galaktosidaseaktivität korreliert (Miller, 1992). Durch Konstruktion von Reporterengenfusionen (vgl. Kapitel 2.5.5 – 2.5.7) kann somit die Aktivität eines Promotors unter diversen Kultivierungsbedingungen bestimmt werden. Eingesetzt wurden folgende Reporterengenfusionen: pJW0, pJW1, pJW2, pJW3, pJW4, pJW5, pJW6, pJW7, pJW8, pJW9, pJW10, pJW11 sowie mini-CTX-*lacZ*. Die Konstrukte pJW1-5 entsprechen dem hypothetischen *nirJEN*-Promotorfragment mit einer Länge von jeweils 463 bp, 363 bp, 266 bp, 166 bp und 66 bp. Die Konstrukte pJW6-11 entsprechen weiteren Verkürzungen und enthalten Mutationen in der hypothetischen Bindestelle und/oder der vermeintlichen IHF Erkennungssequenz.

Bakterienkulturen wurden in der mittleren exponentiellen Phase zentrifugiert (3 min, 16.100 x g, RT). Anschließend wurde das Sediment in 800 µl Z-Puffer resuspendiert

und mit je 25 µl 0,1 % SDS und Chloroform versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei 30 °C wurden 200 µl ONPG (4 mg/ml) hinzugegeben. Bei Gelbfärbung wurde die Farbreaktion mit 500 µl 1 M Na₂CO₃ Lösung gestoppt (t_{\min}). Nach Zentrifugation (10 min, 16.100 x g, RT) wurde die Absorption des gelblichen Überstands bei 420 nm vermessen. Die Bestimmung der Aktivität der β -Galaktosidase erfolgte in Miller Units:

$$\text{Miller Units} = (\text{OD}_{420} * 1000) / (t_{\min} * \text{OD}_{578} * V) \quad (\text{Glg.1})$$

Hierbei ist V das Kulturvolumen, welches zentrifugiert wurde, und OD₅₇₈ die optische Dichte der Bakterien zum Zeitpunkt der Zentrifugation.

Lösungen für β -Galaktosidaseaktivitätsanalysen

Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO ₄	1 mM
	2-Mercaptoethanol	39 mM

2.5.10 Gelretardationsanalysen

Eine Protein-DNA-Wechselwirkung kann *in vitro* mittels Gelretardationsanalyse (Bandshift, Electrophoretic Mobility Shift Assay EMSA) nachgewiesen werden. Aufgrund des höheren Molekulargewichts eines DNA-Proteinkomplexes wandert dieser langsamer in einem nativen Polyacrylamidgel als „freie“ DNA. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Herbst *et al.* (2009) und Heroven & Dersch (2006).

Zu testende DNA-Fragmente bzw. Oligonukleotide wurden äquimolar (25 nM) in Bandshiftpuffer gemischt und mit Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration (0-520 nM) versetzt. Nach Inkubation bei 30 °C für 30 min wurde der Reaktionsansatz auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel oder ein 4-20 %iges, kommerziell erworbenes Polyacrylamidgel (Biorad, München, Deutschland) aufgetragen. Als Längenstandard diente der EZ Load 100 bp Molecular Ruler (Biorad, München, Deutschland) bzw. die Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA). Die Auftrennung erfolgte in 0,5x TBE für circa 90 Minuten bei 70 V. Anschließend wurde das Gel analog zu Kapitel 2.5.4 in Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert.

Die Gelretardationsanalysen wurden stets mit doppelsträngiger DNA durchgeführt. Hierzu wurden die verwendeten Oligonukleotidpaare in Annealing Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die beiden Stränge 1:1 miteinander vermischt und für 3 Minuten bei 95 °C im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde der Heizblock auf 20 °C eingestellt und die Proben langsam darin abgekühlt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Alternativ wurden PCR-Amplifikate (vgl. Kapitel 2.5.5) verwendet, die mit folgenden Primerpaaren hergestellt wurden: oJW14/oJW19, oJW15/oJW19, oJW16/oJW19, oJW17/oJW19 und oJW18/oJW19. Als Templat diente das Plasmid pHAP1 (Arai *et al.*, 1990).

Soweit nicht anderes erwähnt, wurden alle Experimente unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

Lösungen für Gelretardationsanalysen

Annealing Puffer	TRIS-HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	50 mM
	EDTA	1 mM
Bandshiftpuffer	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	10 mM
	DTT	5 mM
	Glycerin	5 %
	MgCl ₂	1 mM
	BSA	0,1 mg/ml
5 %iges Polyacrylamidgel	Rhinohide	300 µl
	10x TBE	0,5 ml
	Rotiphorese Gel 40 (29:1)	1,25 ml
	TEMED	16 µl
	10 % APS	66 µl
	ddH ₂ O	7.9 ml
10x TBE	Tris-HCl	108 g/l
	Borsäure	55 g/l
	EDTA	9,3 g/l

2.5.11 DNaseI-Protektionsanalysen, Kontaktblot und Detektion

Um die exakte Bindestelle eines Proteins an der DNA zu identifizieren, wurden DNaseI-Protektionsanalysen („Footprints“) durchgeführt. Hierzu wurden mittels PCR (vgl. Kapitel 2.5.5) DNA-Fragmente der hypothetischen Promotorregion *upstream* von *nirJ* amplifiziert (*nirJEN*-Promotorfragment). Ein Primer war hierbei unmarkiert (oJW15 bzw. oJW19), der andere war 5'-Dioxigenin (DIG) markiert (oJW2 bzw.

oJW3). Als Templat diente das Plasmid pHAP1 (Arai *et al.*, 1990). In den entstandenen Amplifikaten war damit entweder der codierende bzw. der nicht-codierende Strang DIG markiert. Die Experimente wurden in abgewandelter Form nach Heroven *et al.* (2004) durchgeführt. Es wurden, analog zu Kapitel 2.5.10, 2,5 nM 5'-Dig-markiertes 266 bp langes *nirJEN*-Promotorfragment mit Proteinen unterschiedlicher Konzentration in einem 20 µl Ansatz versetzt und gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurden 5 µl DNaseI (1:128 verdünnt) hinzugegeben. Nach Inkubation von 15 s Dauer wurde die Reaktion mit 50 µl DNaseI-Stopp-Lösung beendet. Bis hierhin erfolgten alle Arbeitsschritte unter anaeroben Bedingungen. Im Anschluss daran wurde die DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wurde jeder Ansatz mit 50 µl Chloroform:Phenol:Isoamylalkohol 25:24:1 (CPI) versetzt, gemischt und zentrifugiert (20 min, 16.100 x g, RT). Der Überstand wurde mit 25 µl 10 M Ammoniumacetat versetzt und mit 2 µl Glykogen (20 mg/ml) vermischt. Durch Zugabe von 300 µl eiskaltem 99,8 % Ethanol *p.a.* und Inkubation für 60 min bei -20 °C wurde die DNA gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, 16.100 x g, 4 °C) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol *p.a.* gewaschen (10 min, 16.100 x g, 4 °C), der Überstand entfernt und das Sediment getrocknet. Nach Aufnahme in 6 µl Probenpuffer wurde der Ansatz bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Vor der eigentlichen Verwendung wurden die Proben bei 85 °C für 3 min denaturiert und anschließend auf ein 6 %iges Sequenziergel aufgetragen.

DIG-markierte Sequenzierreaktionen:

Um die Bindestelle exakt lokalisieren zu können, müssen die Fragmentgrößen der DNaseI-Hydrolyse bestimmt werden. Hierzu wurde eine Sequenzierreaktion mit den oben beschriebenen DIG-markierten Primern durchgeführt. Verwendet wurde das Sequenase DNA Sequencing Kit (USB, Ohio, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Sequenzierreaktion wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert und vor dem Auftrag auf das gleiche 6 %ige Sequenziergel 2 min bei 75 °C denaturiert.

Kontaktblot und Transfer der DNA auf eine Nylonmembran:

Die aufgetrennte DNA aus dem Sequenziergel wurde via Kontaktblot auf eine zurechtgeschnittene Nylonmembran „Nytran N“ (Whatman/GE Healthcare, München, Deutschland) transferiert. Hierzu wurde diese Membran luftblasenfrei auf

das Sequenziergel gerollt, welches auf der nicht silanisierten Glasplatte lag. Nun wurde eine zweite Membran, gefolgt von 5 Blotpapieren auf die erste Membran gelegt und mit der zuvor abgenommenen Glasplatte beschwert. Nach 2 h konnte der Blot abgebaut und die Nylonmembran vorsichtig vom Gel entfernt werden. Anschließend wurde die transferierte DNA auf der Membran mittels UV-Bestrahlung fixiert (UV Stratalinker 2400, Stratgene/Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Membran wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C dunkel und abgedeckt gelagert.

Detektion von DIG-markierter DNA:

Die Detektion der transferierten DIG-markierten DNA erfolgte mittels CDP-Star (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Bei CDP-Star handelt es sich um ein Chemilumineszenzsubstrat, welches von der alkalischen Phosphatase umgesetzt wird. Hierbei kommt es zur Lichtemission, welche mittels Röntgenfilm (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, USA) nachgewiesen werden kann. Die alkalische Phosphatase ist dabei an einen Antikörper (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) gekoppelt, welcher die DIG-Markierung als Antigen erkennt. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Entwicklung des Röntgenfilms (MS Laborgeräte, Dielheim, Deutschland) wurde dieser mittels Fotografie dokumentiert.

Lösungen für DNaseI-Protektionsanalysen

Probenpuffer	Stopp Lösung aus USB Sequencing Kit	1:2 verdünnt
5x DNaseI Puffer	Tris-HCl, pH 7,8	10 mM
	CaCl ₂	12,5 mM
	MgCl ₂	15 mM
	NaCl	200 mM
	DTT	1 mM
DNaseI-Stopp-Lösung	EDTA	15 mM
	Yeast Carrier tRNA	10 µg/ml
Sequenziergel, 6 %	Harnstoff	42 g
	10x TBE	10 ml
	Rotiphorese Gel 40	15 ml
	10 % APS	500 µl
	TEMED	50 µl
	mit ddH ₂ O auffüllen auf 100 ml, 1 Glasplatte silanisieren	

2.5.12 Primer-Extension-Analysen

Um den Transkriptionsstartpunkt des *nirJEN*-Genbereichs zu bestimmen wurde zunächst Gesamtzell-RNA aus *P. aeruginosa*, kultiviert unter aneroben Bedingungen, isoliert (Kapitel 2.4.3). Die Isolation erfolgte nach Steen (2011). 5 µg RNA wurden in FS-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, USA) und RNase freiem Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit oJW1 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,05–3 µM) bei einem Endvolumen von 20 µl vermischt, 10 min bei 80 °C inkubiert und anschließend langsam auf 42 °C abgekühlt (0,01 °C/sek). Danach wurden 3,5 µl Labelling-Mix hinzugegeben und für 1 h bei 42 °C inkubiert.

Für die Reinigung wurden 175 µl TES-Puffer und 200 µl CPI (vgl. Kapitel 2.5.11) hinzugegeben. Nach Zentrifugation (5 min, 16.100 x g, RT) wurde der Überstand mit 2 µl Glykogen (20 mg/ml) vermischt. Durch Zugabe von 500 µl eiskaltem 99,8 % Ethanol *p.a.* und Inkubation für 60 min bei -20 °C wurde die DNA gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, 16.100 x g, 4 °C) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol *p.a.* gewaschen (10 min, 16.100 x g, 4 °C), der Überstand entfernt und das Sediment getrocknet. Nach Aufnahme in 6 µl Probenpuffer wurde der Ansatz bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Vor der eigentlichen Verwendung wurden die Proben bei 85 °C für 3 min denaturiert und anschließend auf ein 6 %iges Sequenziergel aufgetragen.

Die Sequenzierreaktion (durchgeführt mit oJW1) zur exakten Lokalisierung des Transkriptionsstarts, der anschließende Kontaktblot und die Detektion erfolgten wie in Kapitel 2.5.11 beschrieben.

Lösungen für Primer-Extension-Analysen

Probenpuffer	Stopp Lösung aus USB Sequencing Kit	1:2 verdünnt
Labelling-Mix	dNTPs, 8 mM	2.5 µl
	Superscript II Reverse Transkriptase	1 µl
TES-Puffer	Tris-HCl, pH 8	50 mM
	EDTA	5 mM
	NaCl	50 mM

2.5.13 Biparental Mating

Die Transformation von *P. aeruginosa* erfolgte mittels biparental Mating. Das zu transformierende Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm ST18 (Thoma & Schobert,

2009) nach Kapitel 2.5.1 eingebracht. 2 ml einer ü.N.-Kultur des transformierten *E. coli* ST18 wurden mit 200 µl *P. aeruginosa* ü.N.-Kultur vermischt und zentrifugiert (2 min, 9'300 x g, RT). Das Sediment wurde in 100 µl LB, supplementiert mit 75 µl/ml ALA, resuspendiert. 75 µl dieses Gemisches wurden auf eine LB-Platte getropft. Während der sechsstündigen Inkubation bei 37 °C wurde das mobilisierte Plasmid von *E. coli* ST18 auf *P. aeruginosa* übertragen. Anschließend wurde der Tropfen mit einer Impföse von der Platte gekratzt und in 100 µl LB resuspendiert und auf einer LB-Platte, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden Einzelkolonien sichtbar. Die Lagerung erfolgte nach Kapitel 2.4.4.

Sofern das Plasmid in das Chromosom von *P. aeruginosa* integriert werden sollte, wie z.B. für *lacZ*-Reprotergenfusionen, wurde nach Spier (2007) und Steen (2011) verfahren.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Rekombinante Proteinproduktion

Für alle Proteinproduktionen wurden in Vorversuchen die optimale IPTG-Konzentration, die Dauer und die Temperatur der Bakterienkultivierung ermittelt. Hierzu wurden 200 ml LB-Medium, supplementiert mit den entsprechenden Medienzusätzen und Antibiotika, in 500 ml Schikanekolben mit einer ü.N. gewachsenen Vorkultur, transformiert mit den entsprechenden Plasmiden, im Verhältnis 1:100 beimpft. Beim Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 wurden die Kulturen mit unterschiedlichen IPTG-Mengen induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in der Regel vor Induktion und 4 h bzw 16 h nach Induktion) wurden jeweils 1 ml Proben entnommen, zentrifugiert und, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, analysiert. Die Kultivierungsbedingung, die die stärkste Produktion des entsprechenden Proteins zeigte, wurde für die präparative Proteinproduktion genutzt.

2.6.1.1 Produktion der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH

Für die präparative Proteinproduktion von NirD, NirL, NirG bzw. NirH aus *P. aeruginosa* wurden ausgehend von einer Vorkultur des *E. coli* Stamms BL21 (DE3), der das jeweilige Plasmid (pJM1, pET14b-*nirL*, pET14b-*nirG*, pET14b-*nirH*) trug, sechs 1 Liter Schikanekolben beschickt mit 500 ml LB-Medium, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit 5 ml Vorkultur angeimpft.

Für die präparative Proteinproduktion der hypothetischen Komplexe NirD/L bzw. NirG/H wurden die Plasmide pJM2 bzw. pJM3 verwendet.

Nach circa 2,5 h Wachstum bei 200 rpm und 37 °C wurden die Kulturen bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 für 10 min bei 17 °C und 180 rpm weiter inkubiert. Durch Zugabe von 250 µM IPTG wurde die Proteinproduktion induziert. Nach 16 h wurden die Kulturen geerntet (15 min, 3.000 x g, 4 °C), die sedimentierten Zellen in 50 ml Proteinpuffer NirDLGH resuspendiert, erneut zentrifugiert (15 min, 3.000 x g, 4 °C) und die Sedimente bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Abweichend zum oben beschriebenen Verfahren wurden die Zellen für die Proteinproduktion des hypothetischen Komplexes NirD/L bei 37 °C nach Induktion mit IPTG weiterinkubiert. Die Zellernte erfolgte bereits nach 4 h.

Lösungen für die Proteinproduktion der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH

Proteinpuffer NirDLGH	Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
	NaCl	300 mM
	Glycerin	5 %
	DTT	5 mM

2.6.1.2 Produktion des Proteins NirJ

Für die präparative Proteinproduktion von NirJ aus *P. aeruginosa* bzw. *H. thermophilus* wurden ausgehend von einer Vorkultur des *E. coli* Stamms BL21 (DE3), transformiert mit dem Plasmid pET14b-*nirJ*, bzw. pET32a-*nirJ* zwölf 1 Liter Erlenmeyerkolben ohne Schikane befüllt mit 500 ml LB-Medium, supplementiert mit Ampicillin, mit 5 ml Vorkultur angeimpft.

Nach circa 2,5 h Wachstum bei 180 rpm und 37 °C wurden die Kulturen bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 für 10 min bei 17 °C und 160 rpm weiter inkubiert. Durch Zugabe von 500 µM IPTG wurde die Proteinproduktion induziert. Gleichzeitig wurden dem Medium 1 mM Eisencitrat zugesetzt, um den Einbau von Fe-S-Zentren zu fördern.

Nach 16 h wurden die Kulturen für 2 h im Anaerobenzelt inkubiert und anschließend anaerob geerntet (15 min, 3.000 x g, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden je 2 Liter Ausgangskultur in 30 ml anaerobisiertem Proteinpuffer NirJ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung in Anaerobenflaschen bei -20 °C gelagert.

Lösungen für die Proteinproduktion des Proteins NirJ

Proteinpuffer NirJ	Tris-HCl, pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Glycerin	5 %
	Natriumdithionit	5 mM

2.6.1.3 Produktion des Proteins NirA

Für die präparative Proteinproduktion von NirA aus *M. tuberculosis* wurden ausgehend von einer Vorkultur des *E. coli* Stamms BL21 (DE3), transformiert mit den Plasmiden pBCM-CysG6 und pET-nirA, vier 1 Liter Schikanekolben beschickt mit 500 ml LB-Medium, supplementiert mit Kanamycin und Chloramphenicol, mit 5 ml Vorkultur angeimpft.

Nach circa 2,5 h Wachstum bei 200 rpm und 37 °C wurden die Kulturen bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 für 10 min bei 17 °C und 180 rpm weiter inkubiert. Durch Zugabe von 100 µM IPTG und 0,01 % Arabinose wurde die Proteinproduktion induziert.

Das Plasmid pBCM-cysG6 kodiert hierbei für das Protein CysG aus *Salmonella typhimurium*, welches für die Produktion von Sirohäm, das in das Protein NirA eingebaut wird, verantwortlich ist. Um die Sirohäm Produktion und den folgenden Einbau in NirA zu gewährleisten, wurde das Medium zum Zeitpunkt der Induktion mit 1 mM Eisencitrat versetzt. Dies führt zu einer höheren Stabilität von NirA, da durch den Kofaktoreinbau die korrekte Faltung gefördert wird (Schnell *et al.*, 2005).

Nach 16 h wurden die Kulturen geerntet (15 min, 3.000 x g, 4 °C), die sedimentierten Zellen in 50 ml Proteinpuffer NirA resuspendiert, erneut zentrifugiert (15 min, 3.000 x g, 4 °C) und die Sedimente bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Lösungen für die Proteinproduktion des Proteins NirA

Proteinpuffer NirA	Tris-HCl, pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM

2.6.1.4 Produktion des Proteins CysG

Für die präparative Proteinproduktion von CysG aus *E. coli* wurden ausgehend von einer Vorkultur des *E. coli* Stamms BL21 (DE3), transformiert mit dem Plasmid pETDuet-1-cysG, vier 1 Liter Erlenmeyerkolben ohne Schikane befüllt mit 500 ml LB-Medium, supplementiert mit Ampicillin, mit 5 ml Vorkultur angeimpft.

Nach circa 2,5 h Wachstum bei 180 rpm und 37 °C wurden die Kulturen bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 für 10 min bei 17 °C und 160 rpm weiter inkubiert. Durch Zugabe von 250 µM IPTG wurde die Proteinproduktion induziert. Gleichzeitig wurden dem Medium 1 mM Eisencitrat zugesetzt, um den Einbau von Eisen als Zentralion in Sirohäm zu begünstigen.

Nach 16 h wurden die Kulturen für 2 h im Anaerobenzelt inkubiert und anschließend anaerob geerntet (15 min, 3.000 x g, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden je 2 Liter Ausgangskultur in 30 ml anaerobisierten Proteinpuffer CysG resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung in Anaerobenflaschen bei -20 °C gelagert.

Lösungen für die Proteinproduktion des Proteins CysG

Proteinpuffer CysG	Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
	NaCl	300 mM
	Glycerin	5 %
	DTT	5 mM

2.6.1.5 Produktion des Proteins NirDL

Die präparative Proteinproduktion des Proteins NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus* erfolgte nach Gädke (2011). Hierbei handelt es sich um ein Homolog zu den Proteinkomplexen NirD/L bzw. NirG/H aus *P. aeruginosa*. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Proteinen aus *P. aeruginosa* (vgl. Kapitel 1.3.1.5) handelt es sich bei NirDL aus *H. thermophilus* um ein Fusionsprotein. Dieses Protein wurde bisher nicht näher charakterisiert.

2.6.2 Zellaufschluss und Ultrazentrifugation

Die Zellsedimente aus 1 Liter Zellkultur wurden in je 15 ml Proteinpuffer suspendiert und vereinigt. Die Zellen wurden zweimal in der French Press (Polytech, Sembach, Deutschland) bei einem Druck von ca. 13.000 psi aufgeschlossen. Der erhaltene

Extrakt wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge L90-K (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert (60 min, 110.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde auf 4 °C gekühlt und direkt für die Proteinreinigung verwendet.

2.6.3 Proteinreinigung durch Metallchelataffinitätschromatographie

Zur Reinigung von His₆-Tag fusionierten Proteinen diente die Metallchelataffinitätschromatographie mit Nickel-Ionen.

Als Säulenmatrix wurde mit Nickel-Ionen beladene Chelating Sepharose (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Diese wurde zunächst mit 5 Säulenvolumen (SV) Proteinpuffer äquilibriert. Der Überstand nach dem Zellaufschluss und anschließender Ultrazentrifugation wurde über 2,5 ml Säulenmatrix in einer Tropfsäule gegeben. Dabei wurde das jeweilige Protein über den His₆-Tag an die Nickel-Ionen des Säulenmaterials gebunden.

Nicht gebundene Proteine wurden mit 5 SV Proteinpuffer von der Säule gewaschen. Unspezifische Bindungen von Proteinen ohne His₆-Tag an die Nickel-Ionen wurden verringert, indem die Nickel-Chelating Sepharose zusätzlich fünfmal mit einem SV Imidazol-Waschlösung gewaschen wurde. Die Elution erfolgte mit dreimal einem SV Elutionslösung. Die erhaltenen Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Säule wurde nach der Regeneration in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

Lösungen für die Metallchelataffinitätschromatographie

Imidazol-Waschlösung	Imidazol In Proteinpuffer	50 mM
Elutionslösung	Imidazol In Proteinpuffer	500 mM
Das Säulenmaterial wurde durch folgende Lösungen regeneriert.		
Regeneration der Säule	Säulenpuffer	2 SV
	6 M Guanidinium-Hydrochlorid	2 SV
	ddH ₂ O	10 SV
	100 mM NiSO ₄	2 SV
	ddH ₂ O	5 SV
Säulenpuffer	TRIS-HCl, pH 8	20 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	500 mM

2.6.4 Umpufferung von Proteinlösungen

Sofern für Untersuchungen die Proteine in einem anderen Puffer als der entsprechende Proteinpuffer benötigt wurden, erfolgte eine Umpufferung mittels NAP-25 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) bzw. Bio-Spin Säulen (Biorad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Säulen wurden bis zur erneuten Verwendung bei 8 °C in ddH₂O gelagert.

2.6.5 Extraktion von Sirohäm

Um den Kofaktor Sirohäm aus dem Protein NirA (vgl. Kapteil 2.6.1.3) zu isolieren, wurde eine Säurefällung nach Hirasawa-Soga *et al.* (1983) durchgeführt. Die weitere Reinigung des Kofaktors erfolgte nach Gädke (2011). Alle Arbeitsschritte wurden hierbei anaerob durchgeführt. Der extrahierte Kofaktor wurde bis zur weiteren Verwendung in Anerobenflaschen bei -20 °C gelagert.

2.7 Proteincharakterisierung

2.7.1 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde mit dem Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Hierfür wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt.

Die Messungen wurden mit einem UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia/GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt.

Sofern eine Konzentrierung der Proteinlösung notwendig war, wurde diese nach Angaben des Herstellers mit VivaSpin 15 Konzentratoren (Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

2.7.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE ermöglicht die Trennung und Visualisierung von Proteinmolekülen nach deren relativer Molekularmasse (M_r) (Laemmli, 1970). Durch den Vergleich mit einem Proteingrößenstandard kann die Molekularmasse abgeschätzt werden.

Polyacrylamidgele sind inert und entstehen durch Polymerisation von Acrylamid, das über Methylenbisacrylamid quervernetzt wird. Diese Verknüpfung wird von Sulfatradikalen des Ammoniumperoxodisulfats ausgelöst. N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient als basischer Katalysator bei der Polymerisation.

Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld zur Anode, da sie durch Anlagerung mit SDS denaturiert und mit einer stark negativen äußeren Ladung versehen sind. Kleine Proteine durchwandern dadurch die Matrix schneller als große Proteine. Eine Erhöhung der Bandenschärfe und Trennleistung wird durch die Verwendung eines Trenn- und Sammelgels, an deren Grenze die Proteine durch einen pH-Shift fokussiert werden, erreicht (Righetti, 1990). Es wurden jeweils 6 %ige Sammelgele und 12 %ige bzw. 15 %ige Trenngele verwendet.

Probenvorbereitung:

Zur Analyse heterolog produzierter Proteine wurde 1 ml Zellkultur sedimentiert (2 min, 16.100 x g, RT), in 50 µl dH₂O resuspendiert, mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Um Zelltrümmer und chromosomale DNA abzutrennen, wurden die Proben anschließend zentrifugiert (2 min, 16.100 x g, RT) und der Überstand für die SDS-PAGE eingesetzt.

Proteinfraktionen aus chromatographischen Reinigungen (vgl. Kapitel 2.6.3) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und direkt für die SDS-PAGE eingesetzt.

Elektrophorese und Färbung:

Das für die SDS-PAGE eingesetzte Probenvolumen betrug jeweils 10 µl. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 45 mA pro Gel für circa 45 min durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch das Schwenken in Färbelösung (ca. 1 h) und anschließend in Entfärbelösung bis klare Banden erkennbar waren. Nachdem das Gelbild eingescannt wurde, konnte das SDS-Gel konserviert

werden, indem es zwischen zwei in H₂O eingeweichten Cellophanfolien in einen Rahmen gespannt ü. N. getrocknet wurde.

Verwendete Lösungen für die SDS-PAGE

Rotiphorese Gel 30 (Roth)	Acrylamid Bisacrylamid	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)
Trenngel (12 %) für 4 Gele	Rotiphorese Gel 30 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS 10 % APS TEMED ddH ₂ O	8 ml 5 ml 200 µl 20 µl 7 ml
Trenngel (15 %) für 4 Gele	Rotiphorese Gel 30 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS 10 % APS TEMED ddH ₂ O	10 ml 5 ml 200 µl 20 µl 5 ml
Sammelgel (6 %) für 4 Gele	Rotiphorese Gel 30 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS 10 % APS TEMED ddH ₂ O	2 ml 2,5 ml 100 µl 10 µl 5,25 ml
SDS-Laufpuffer	TRIS-HCl, pH 8,8 Glycin SDS	50 mM 385 mM 0,1 % (w/v)
SDS-Probenpuffer	1 M TRIS-HCl, pH 6,8 20 % (w/v) SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	2,4 ml 4 ml 2,4 ml 1,2 ml 0,2 % (w/v)
Färbelösung	Essigsäure Ethanol Coomassie Brilliant Blue G250 in ddH ₂ O	10 % (v/v) 30 % (v/v) 0,25 % (w/v)
Entfärbelösung	Essigsäure Ethanol in ddH ₂ O	10 % (v/v) 30 % (v/v)

2.7.3 Western Blot und Nachweis von Proteinen mittels Ponceau S

Das Western Blotting ist eine sensitive Methode zum Nachweis von Proteinen. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung in einer SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.7.2) werden die Proteine auf eine Membran transferiert und so immobilisiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Proteinnachweis kann nun durch einen Primärantikörper erfolgen, der ein Epitop des Proteins erkennt. Durch einen Sekundärantikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, kann dieser Primärantikörper anhand der enzymatischen Reaktion

direkt und das zu detektierende Protein folglich indirekt nachgewiesen werden. Alternativ kann das Protein direkt mit dem Azofarbstoff Ponceau S angefärbt werden. Zur Durchführung eines Western Blots wurde eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) für 15 min in 100 % Methanol aktiviert. Das ungefärbte SDS-Gel, zwei Blotting-Papiere und die aktivierte Membran wurden anschließend in Towbin-Puffer äquilibriert. Das SDS-Gel und die PVDF-Membran wurden zwischen die Blotting-Papiere gelegt und die Proteine durch eine konstante Spannung von 10 V für eine Stunde auf die PVDF-Membran transferiert.

Proteinnachweis mittels Ponceau S:

An den Blotvorgang schloss sich eine Ponceau S Färbung an. Hierzu wurde die Membran circa 2 Minuten bei RT in 1 x Ponceau S-Lösung geschwenkt. Sobald Proteinbanden sichtbar wurden, wurde die Lösung abgeschüttet und die Membran bis zur Dokumentation in ddH₂O gelagert.

Lösungen für das Western Blotting

Towbin-Puffer	TRIS-HCl, pH 9.5	25 mM
	Glycin	192 mM
1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
PBS-Tween	Tween 20 in 1x PBS	0,1 % (v/v)
5 x Ponceau S	Ponceau S	0,4 g
	TCA	6 g
	5-Sulfosalicylsäure	6 g
	Auf 20 ml mit ddH ₂ O auffüllen, filtrieren und bei 4 °C lagern	

2.7.4 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung beruht auf dem Edman-Abbau (Edman & Begg, 1967). Nach Koppelung des Edman-Reagenz Phenylisothiocyanat (PITC) an die N-terminale Aminogruppe des zu sequenzierenden Proteins wird diese durch Zugabe von Säure abgespalten. Durch Chromatographie können nun die abgespaltenen Aminosäuren, im Vergleich mit Referenzproben, identifiziert und quantifiziert werden.

Proteinbanden aus Kapitel 2.7.3 wurden ausgeschnitten, in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und von R. Getzlaff am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig an einem Sequenziergerät von Applied Biosystems vermessen.

2.7.5 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie (GPC) werden Makromoleküle nach deren hydrodynamischen Radius an einem porösen Säulenmaterial aufgetrennt. Kleinere Makromoleküle können in den Poreninnenraum der Matrix diffundieren, was zu einer verlängerten Retentionszeit führt. Je kleiner ein Molekül ist, umso später wird es von der Säule eluiert (Lottspeich & Zorbas, 1998). Die Detektion erfolgt hierbei mittel UV-Absorption bei 280 nm.

Dieses Verfahren wurde genutzt, um den Oligomerenstatus eines Proteins zu bestimmen. Hierzu wurde eine 10/300 Superdex 75-Säule (Pharmacia Biotech/GE Healthcare, München, Deutschland), angeschlossen an eine Äkta purifier FPLC (Amersham Biosciences/GE Healthcare, München, Deutschland), verwendet. Die Flussrate betrug hierbei 0,7 ml/min. Der Oligomerenstatus konnte mit einer Kalibriergerade, die mit Proteinstandards (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) erstellt wurde, anhand der Retentionszeit bestimmt werden.

Des Weiteren wurde die GPC genutzt, um Proteine präparativ zu reinigen. Hierbei wurde eine 16/60 Superdex 200-Säule (Pharmacia Biotech/GE Healthcare, München, Deutschland), angeschlossen an eine Äkta purifier-FPLC (Amersham Biosciences/GE Healthcare, München, Deutschland), verwendet. Die Flussrate betrug hierbei 1,0 ml/min. Das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen gesammelt.

Als Laufmittel diente der jeweilige Proteinpuffer (vgl. Kapitel 2.6). Die Säule wurde vor und nach Verwendung mit 2 SV ddH₂O gespült und anschließend in 20 % EtOH gelagert.

2.7.6 Eisen- und Schwefelbestimmung

Für die Bestimmung des Eisengehalts einer Proteinprobe wurde die Methode nach Lovenberg (Lovenberg *et al.*, 1963) verwendet. Nach PCA-Fällung des Proteins und Zugabe von Bathophenantrolin-Disulfonat, Natriumascorbat und

Ammoniumacetatlösung wurde der erhaltene rötliche Fe(II)-Ionen-Komplex photometrisch am UV/VIS Spektrophotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia/GE Healthcare, München, Deutschland) vermessen. Hierbei wurde die Differenz der Absorption bei den Wellenlängen 535 nm und 680 nm gebildet. Der Eisengehalt konnte so exakt anhand einer Kalibriergerade, die mit einem käuflich erworbenen Eisenstandard (Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) erstellt wurde, bestimmt werden.

45 µl 1 M PCA wurden zu 65 µl Proteinlösung gegeben, stark vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 16.100 x g, RT) wurden 90 µl des Überstandes in ein frisches Reagiergefäß überführt und 72 µl Bathophenanthrolin-Disulfonat (1,7 mg/ml), 36 µl L-Ascorbat (38 mg/ml) und 27 µl Ammoniumacetat-Lösung (gesättigt, anschließend 1:3 verdünnt) hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen und 30 minütiger Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert (5 min, 16.100 x g, RT) und der Überstand photometrisch vermessen.

Für die Bestimmung des Schwefelgehalts einer Proteinprobe wurde die Methode nach Beinert (Beinert, 1983) verwendet. Hierbei wird der Schwefel als Sulfid aus dem Fe-S-Zentrum freigesetzt und als Zinksulfid gebunden. Durch Ansäuern reagiert entstandener Schwefelwasserstoff mit Dimethyl-p-phenyldiamin (DMPD), wodurch Methylenblau entsteht. Dieser Phenothiazin-Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge von 670 nm am Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia/GE Healthcare, München, Deutschland) vermessen. Der Schwefelgehalt konnte so exakt anhand einer Kalibriergerade, die mit einer 1 mM Natriumsulfid-Lösung diverser Verdünnungsstufen erstellt wurde, bestimmt werden.

300 µl Zinkacetat-Lösung (1 % (w/v)) wurden mit 100 µl Proteinlösung versetzt und mit 15 µl NaOH (3 M) neutralisiert. Nach starkem Vermischen und 5 min Inkubation bei RT wurden 75 µl DMPD (0,1 % (w/v) in 5 M HCl) und 16 µl FeCl₃ (23 mM in 1 M HCl) hinzugegeben, gründlich durchmischt und für 3 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 16.100 x g, RT) konnte der Überstand photometrisch vermessen werden.

2.8 Analytik

2.8.1 Massenspektrometrie

Um Substanzen wie z.B. isolierte Tetrapyrrole (vgl. Kapitel 2.6.4) näher zu analysieren, wurden massenspektrometrische Analysen von Dr. Hans Martin Schiebel in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Bremen durchgeführt. Es wurden ESI-qTOF-MS- und MS/MS-Spektren aufgenommen.

Des Weiteren wurden HPLC-MS-Analysen in Kooperation mit Dipl.-Chem. Alexander Neuman vom Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

2.8.2 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektroskopie bezeichnet die Messung der Absorption einer zu untersuchenden Substanz im ultravioletten ($\lambda = 180 - 400 \text{ nm}$) bis zum sichtbaren Licht ($\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$). Besonders für die Analyse von Molekülen mit delokalisierten π -Elektronen-Systemen, wie Aromaten und Tetrapyrrolen, ist die UV/Vis-Spektroskopie geeignet (Vollhardt und Schore, 2000).

Von einer Lichtquelle werden elektromagnetische Wellen einer definierten Wellenlänge durch die Probe geleitet und von einem Detektor aufgefangen. Unterschiede in der Intensität zwischen eingestrahelter und detektierter Wellenlänge werden als Peak sichtbar. Die Peakhöhe ist proportional zur Konzentration des eingesetzten Moleküls. Somit kann eine Substanz quantitativ, auf Grund der Peakhöhe, und qualitativ, auf Grund der Lage der Peaks und des Erscheinungsbildes des Spektrogramms, analysiert werden.

Die Messungen wurden an einem V650-Spektroskop (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt.

2.8.3 Fluoreszenz-Spektroskopie

Unter Fluoreszenz versteht man die verzögerungsfreie Emission im Nanosekundenbereich ohne Nachleuchten. Bei Anregung einer Substanz mit einer

bestimmten Wellenlänge kommt es stets zu einer Verschiebung der Emissionswellenlänge hin zum längerwelligen Bereich. Dieser Effekt wird Stokes-Shift genannt. Das so entstandene Anregungs-/Emissionwellenlängen-Paar kann damit zur Identifizierung von Substanzen genutzt werden (Atkins and de Paula, 2006). Wie auch die UV/Vis-Spektroskopie, so ist auch die Fluoreszenz-Spektroskopie für die Analyse von Molekülen mit delokalisierten π -Elektronen-Systemen, wie Aromaten und Tetrapyrrole, geeignet (Vollhardt und Schore, 2000).

Die Messungen wurden an einem L550B-Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer, Waltham, USA) durchgeführt.

2.8.4 Tetrapyrrolanalyse mittels HPLC

Um isoliertes Sirohäm (vgl. Kapitel 2.6.4) näher zu analysieren, wurde zunächst die bereits beschriebene HPLC-Trennmethode (Lawrence, 2006) etabliert und optimiert. Hierfür wurde anstelle der bisher verwendeten C₁₈-reversed Phase Säule Ace 5 AQ 5 μ m, 150 x 2,1 mm eine Reprosil Pur AQ, 5 μ m, 150 x 2,1 mm (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) eingesetzt. Die Säule und die HPLC-Anlage (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) wurden in 100% Methanol (HPLC-Grade) (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gelagert.

Um schwer lösliche Bestandteile der Proben zu entfernen, wurden die Ansätze zentrifugiert (5 min, 16.100 x g, RT). Anschließend wurden die Überstände filtriert (Porendurchmesser 0,45 μ m) und in HPLC-Glasröhrchen überführt. Das Injektionsvolumen betrug 20-60 μ l.

Die Flussrate betrug 0,2 mL pro Minute. Laufmittel A war Milli-Q H₂O mit 0,01 % Trifluoressigsäure (TFA) und Laufmittel B 100% Acetonitril (HPLC-Grade) (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Das Laufmittel A wurde vor der Verwendung 10 min lang bei 60 mbar im Ultraschallbad entgast und filtriert. Folgender Gradient wurde für die Trennung verwendet:

00-06 min:	linearer Gradient von 5 % B auf 20 % B
06-25 min:	linearer Gradient von 20 % B auf 30 % B
25-30 min:	linearer Gradient von 30 % B auf 100 % B
30-40 min:	100 % B
40-45 min:	linearer Gradient von 100 % B auf 5 % B

45-55 min: 5 % B

Zu jedem Zeitpunkt der HPLC-Trennung wurde für die Identifizierung der Tetrapyrrole ein UV/Vis-Spektrum im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 700 nm mittels Diodenarray (MD-2015) aufgenommen. Des Weiteren wurden die Tetrapyrrole mittels eines Fluoreszenzdetektors (FP-2020) identifiziert.

2.9 Enzymaktivitätstests

2.9.1 *In vitro*-Aktivitätstests ausgehend von 5-Aminolävulinsäure

Um zu untersuchen, ob die Enzyme NirDLGH aus *P. aeruginosa* Sirohydrochlorin zu 12,18-Didecarboxysirohydrochlorin decarboxylieren können, wurde der gekoppelte Enzymassay nach Storbeck *et al.* (2009) modifiziert. Dieser Assay wurde ebenfalls dazu verwendet, eine katalytische Funktion für NirJ zu detektieren, sofern dessen Substrat Precorrin-2 bzw. Sirohydrochlorin ist. In einem Endvolumen von 500 µl wurden 1 mM ALA, 0,14 µM HemB aus *P. aeruginosa*, 0,15 µM HemC aus *Bacillus megaterium* und 0,17 µM HemD aus *B. megaterium* (Frankenberg *et al.*, 1998 und Raux *et al.*, 2003), 1,5 µM NirE aus *P. aeruginosa* (Storbeck *et al.*, 2009) und 200 µM SAM in Enzymassaypuffer vermischt und für 4 h bei 37 °C und Dunkelheit inkubiert. Die Oxidation von Precorrin-2 zu Sirohydrochlorin erfolgte durch Zugabe von 1,5 µM SirC aus *B. megaterium* und 100 µM NAD⁺. Es wurde je 2 µM NirD, NirL, NirG, NirH, NirD/L, NirG/H bzw. NirDLGH und NirJ (vgl. Kapitel 2.6.1.1/2) hinzugegeben. Der Enzymaktivitätstest wurde, soweit nicht anders beschrieben, unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Der Verlauf des Enzymaktivitätstests wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie (vgl. Kapitel 2.8.2), Fluoreszenz-Spektroskopie (vgl. Kapitel 2.8.3) und HPLC-Analysen (vgl. Kapitel 2.8.4) verfolgt.

Lösungen für den *in vitro*-Aktivitätstest ausgehend von 5-Aminolävulinsäure

Enzymassaypuffer	Tris-HCl, pH 8	50 mM
	KCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NaCl	50 mM

2.9.2 *In vitro*-Aktivitätstests ausgehend von isoliertem Sirohäm

Um zu untersuchen, ob die Enzyme NirDLGH Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm decarboxylieren können, wurde der folgende Enzymassay etabliert. Zu anaerob isoliertem Sirohäm (vgl. Kapitel 2.6.5) wurden je 2 µM NirD, NirL, NirG, NirH, NirD/L, NirG/H bzw. NirDLGH (vgl. Kapitel 2.6.1.1) in einem Endvolumen von 500 µl in Enzymassaypuffer (vgl. Kapitel 2.9.2) hinzugegeben. Alternativ wurden zusätzlich 50 µl zellfreien Extrakts aus anaeroben *P. aeruginosa*-Kulturen (vgl. Kapitel 2.4.2 imd 2.6.2) eingesetzt, um den Einfluss von evtl. nötigen Kofaktoren zu untersuchen. Anschließend wurde der Ansatz für 4 h bei 37 °C und Dunkelheit inkubiert. Der Enzymaktivitätstest wurde, soweit nicht anders beschrieben, unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Der Verlauf des Enzymaktivitätstests wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie (vgl. Kapitel 2.8.2) und HPLC-Analysen (vgl. Kapitel 2.8.4) verfolgt.

2.10 Proteinkristallisation

Für Kristallisationsversuche wurden die mittels Gelpermeationschromatographie gereinigten (vgl. Kapitel 2.7.5) Proteinkomplexe NirG/H, c = 9 mg/ml, und NirD/L, c = 6 mg/ml (vgl. Kapitel 2.6.1.1) aus *P. aeruginosa* und das Fusionsprotein NirDL, c = 12 mg/ml aus *H. thermophilus* (vgl. Kapitel 2.6.1.5) verwendet. Die Kristallisationsversuche erfolgten nach der *sitting drop vapor diffusion*-Methode (McRee, 1993 und Rhodes, 1993). Mit Hilfe des Pipettierroboters Honeybee 961 (Zinsser Analytic, Deutschland) wurden in Kooperation mit der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am HZI Braunschweig 200 nl Reservoirpuffer mit 200 nl Protein vermischt. Das Kristallwachstum wurde über drei Wochen verfolgt. Folgende Kristallisations-Screens (QiaGen, Hilden, Deutschland) wurden verwendet:

- JCSG I-IV
- The Cations & The Anions
- Ammonium Sulfate
- The PEGs Suite
- The PACT Suite
- Morpheus

Erste Kristalle wurden reproduziert und mit verschiedenen Techniken (z.B. per „Grid-Screen“, Additive Screen oder verschiedene Seeding-Techniken) optimiert. Die erhaltenen Kristalle wurden mit ca. 30 % Glycerin „gesocked“, um sie in flüssigem Stickstoff schockgefrieren zu können. Erste Beugungstest wurden am HZI Braunschweig mit einem Rigaku Röntgengenerator, ausgestattet mit einem Saturn 944+ Detektor (Rigaku, Sevenoaks, UK), ausgeführt. Die ersten verwertbaren Datensätze wurden in der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY, Berlin, Deutschland) an der „Beamline“ 14.1 gemessen. Die Strukturaufklärung und Verfeinerung wird am HZI Braunschweig in Kooperation mit Dr. Stefan Schmelz, Abteilung für Molekulare Strukturbiologie, durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Initiale biochemische Charakterisierung des Proteins NirJ

Ein Ziel dieser Arbeit war, das Protein NirJ aus dem *nir*-Operon von *P. aeruginosa* biochemisch zu charakterisieren. Hierzu sollte das Protein heterolog in *E. coli* produziert und mittels Metallchelataffinitätschromatographie gereinigt werden. Alternativ hierzu sollte eine biochemische Charakterisierung des homologen Proteins NirJ aus *H. thermophilus* durchgeführt werden. Die chromatographische Reinigung der Proteine sollte unter anaeroben Bedingungen erfolgen.

Im Anschluss daran sollte der Eisen- und Schwefelgehalt des Proteins NirJ bestimmt und ein *in vitro*-Aktivitätstest etabliert werden.

3.1.1 Präparation des Proteins NirJ

Die heterologe Produktion des Proteins NirJ aus *P. aeruginosa* erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Nach Induktion des Stamms *E. coli* BL21 (DE3), der das Plasmid pET14b-*nirJ* trug sowie Zellernte, Zellaufschluss und Reinigung mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Kapitel 2.6.1.2, 2.6.2 und 2.6.3) wurden die erhaltenen Protein-Fractionen mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass das überproduzierte Protein NirJ unlöslich vorlag. Veränderungen der Kultivierungsbedingungen sowie der Einsatz von Detergenzien (Triton-X 100, Brij-35) führten nicht zu einer Solubilisierung des Proteins NirJ aus *P. aeruginosa*.

Aus diesem Grund wurde eine Reinigung des Proteins NirJ aus *H. thermophilus* durchgeführt. Nach Induktion des Stamms *E. coli* BL21 (DE3), der das Plasmid pET32a-*nirJ* trug sowie Zellernte, Zellaufschluss und Isolierung mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Kapitel 2.6.1.2, 2.6.2 und 2.6.3) wurden die erhaltenen Protein-Fractionen in einer SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) analysiert (Abbildung 13).

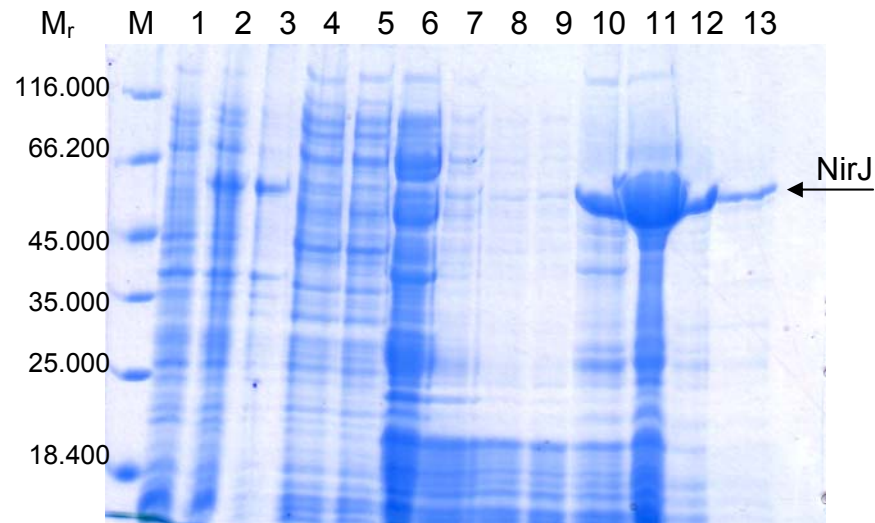


Abbildung 13: SDS-PAGE-Gel der Präparation des Proteins NirJ aus *H. thermophilus* mittels Metallchelataffinitätschromatographie nach Produktion in *E. coli* BL21 (DE3).

Spur M: 5 µl Page Ruler™ Protein Ladder, die relativen Molekularmassen (M_r) der Markerproteine sind angegeben. **Spur 1:** Proteine einer bakteriellen Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 0 h bei Induktion. **Spur 2:** Proteine einer Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 20 h nach Induktion. **Spur 3:** Unlösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 4:** Lösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 5:** Proteine im Durchlauf der Metallchelataffinitätschromatographie. **Spur 6-9:** Proteine der Waschfraktionen. **Spur 10-13:** Proteine der Elutionsfraktionen der Metallchelataffinitätschromatographie.

Die Laufhöhe des gewünschten Proteins NirJ mit einem relativen Molekulargewicht M_r von circa 54.000 ist mit einem Pfeil markiert. Es setzt sich zusammen aus dem eigentlichen relativen Molekulargewicht des Proteins (ca. 41.500) und des Trx-Tags (ca. 12.500)

Es ist deutlich erkennbar, dass auch für NirJ aus *H. thermophilus* ein sehr großer Anteil des produzierten Proteins, trotz Vorhandensein des Trx-Tags, unlöslich vorlag (Spur 3). Dies könnte daran liegen, dass die hypothetischen Eisen-Schwefel-Zentren nicht vollständig eingebaut wurden und es zu einer Fehlfaltung des apo-Proteins kam. In den Waschfraktionen (Spuren 6-9) wurde zunehmend weniger Protein eluiert, so dass von einem ausreichenden Waschen der Säule ausgegangen werden kann. Das Protein NirJ mit einem relativen Molekulargewicht von circa 54.000 (natives NirJ + Trx-Tag) befand sich in den Elutionsfraktionen 1 bis 4 (Spuren 10-13), die vereinigt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, waren in den Elutionsfraktionen trotz Metallchelataffinitätschromatographie noch weitere, unerwünschte Proteine enthalten. Die Reinheit des Proteins NirJ wird auf ca. 80 % geschätzt. Die Präparation von NirJ aus

H. thermophilus lieferte eine Ausbeute von circa 6 mg NirJ pro Liter bakterieller Zellkultur.

3.1.2 Biochemische Charakterisierung des Proteins NirJ aus *Hydrogenobacter thermophilus*

Wie in Kapitel 1.3.4.3 beschrieben, ergaben bioinformatische Studien (Winsor *et al.*, 2009; Zumft, 1997), dass es sich bei dem Protein NirJ um ein Eisen-Schwefel-Protein handeln könnte. Diese Hypothese ist auf das Vorhandensein eines CXXXCXXC-Aminosäuresequenzmotivs zurückzuführen, dessen Cysteinreste ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster koordinieren könnten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde zunächst ein UV/Vis-Absorptionsspektrum des gereinigten Proteins NirJ aus *H. thermophilus* aufgenommen (Kapitel 2.8.2), welches in Abbildung 14 gezeigt ist.

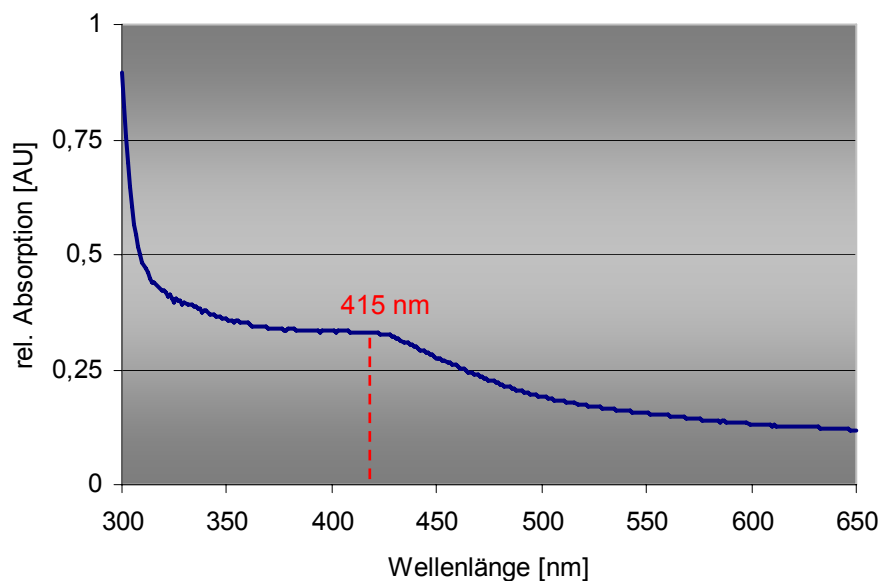


Abbildung 14: UV/Vis-Absorptionsspektrum des gereinigten Proteins NirJ aus *H. thermophilus*.

Das Spektrum von gereinigtem NirJ (1,1 mg/ml) wurde unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Im Bereich bei ca. 415 nm ist ein Absorptionsmaximum erkennbar (rot markiert). Die rel. Absorption [AU] ist gegen die Wellenlänge [nm] aufgetragen.

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum von NirJ weist ein Absorptionsmaximum bei ca. 415 nm auf. Im Einklang mit der leicht bräunlichen Färbung des gereinigten Proteins ist dies typisch für Proteine, welche ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum besitzen. Das UV/Vis-Absorptionsspektrum stellt jedoch nur ein qualitatives Merkmal dar. Für quantitative

Aussagen wurde der Eisen- und Schwefelgehalt von gereinigtem NirJ bestimmt (Kapitel 2.7.6). Hierfür wurden parallel zur Vermessung der NirJ-Lösung Kalibriergeraden mit Fe- bzw. S²⁻-Eichlösungen erstellt (Abbildung 15 und 16).

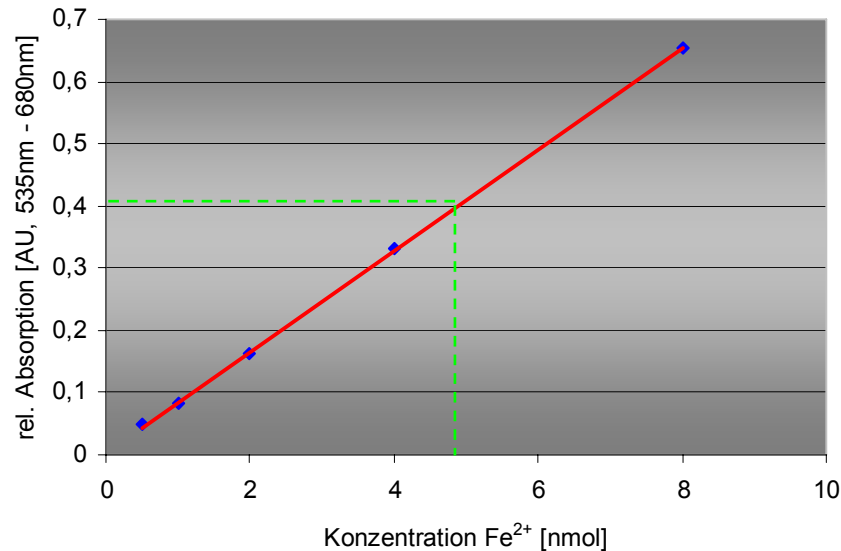


Abbildung 15: Bestimmung des Eisengehalts von gereinigtem NirJ aus *H. thermophilus*. Blau dargestellt sind die aufgenommenen Messpunkte der Fe-Eichlösung. Rot dargestellt ist die berechnete Kalibriergerade. Die Gleichung lautet: $y = 0,0813x + 0,0038$ (Glg. 2) bei $R^2 = 0,999$. Der Messwert der Proteinprobe (1,1 mg/ml) ist grün gestrichelt eingezeichnet.

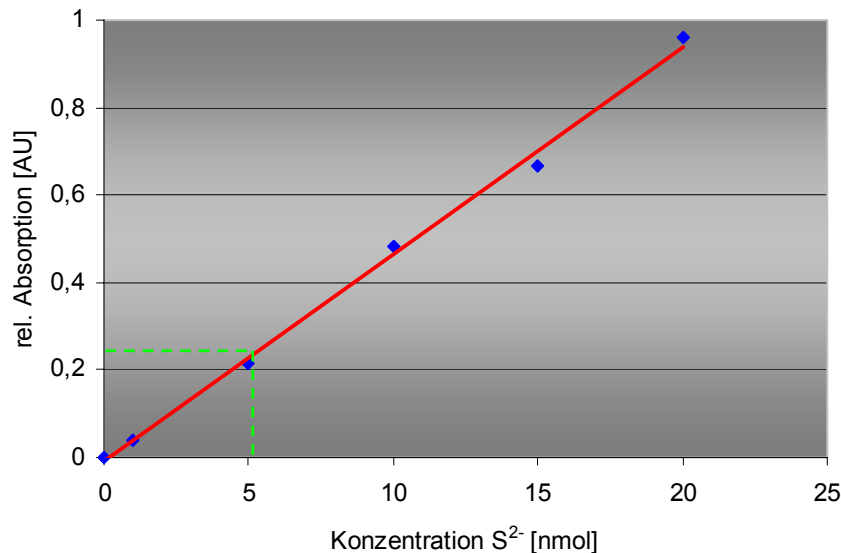


Abbildung 16: Bestimmung des Schwefelgehalts von gereinigtem NirJ aus *H. thermophilus*. Blau dargestellt sind die aufgenommenen Messpunkte der S²⁻-Eichlösung. Rot dargestellt ist die berechnete Kalibriergerade. Die Gleichung lautet: $y = 0,0474x - 0,0098$ (Glg. 3) bei $R^2 = 0,997$. Der Messwert der Proteinprobe (1,1 mg/ml) ist grün gestrichelt eingezeichnet.

Für das gereinigte NirJ aus *H. thermophilus* wurde, unter Berücksichtigung der Reinheit von 80 %, ein Eisengehalt von 4,8 nmol Fe pro nmol NirJ und ein Schwefelgehalt von 3,7 nmol S²⁻ pro nmol NirJ bestimmt. In Kombination mit dem UV/Vis-Spektrum (Abbildung 14) kann aus diesen Daten auf das Vorhandensein eines [4Fe-4S]²⁺-Zentrums geschlossen werden.

Sowohl das isolierte Protein NirJ aus *H. thermophilus* als auch ein zellfreier Extrakt eines NirJ aus *P. aeruginosa* produzierenden *E. coli* BL21 (DE3)-Stamms wurden für *in vitro*-Aktivitätstest nach Kapitel 2.9.1 eingesetzt. Die Enzymaktivitätstests wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, so dass der postulierte „Radical-SAM“-Mechanismus durch oxidierenden Sauerstoff nicht behindert wurde. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie und HPLC-Analysen. Leider konnte keine Enzymaktivität beobachtet werden. Es wäre durchaus denkbar, dass ein evtl. nötiges Kosubstrat, wie z.B. FMN, FAD, NAD, NAD⁺, NADP oder NADP⁺ für die Durchführung der Redoxreaktion fehlte. Da diese aber in den aufgeschlossenen Zellen vorhanden sind und zusätzlich zugesetzt wurden, kann auch dies als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit, warum keine Enzymaktivität für NirJ zu beobachten war, könnte die störende Übermethylierung des Precorrin-2 zu Trimethylpyrrocorphin sein (beschrieben in Storbeck *et al.*, 2009), welches im Folgenden nicht mehr von dem Protein NirJ als Substrat akzeptiert wird.

Eine weitere Erklärung für die fehlende NirJ Aktivität besteht darin, dass weder Precorrin-2 noch dessen oxidierte Form Sirohydrochlorin als Substrat für NirJ dienen. Dies würde mit der Hypothese von Prof. Dr. M. J. Warren übereinstimmen (mündliche Mitteilung), welche besagt, dass zuerst der Einbau des Eisens ins Tetrapyrrol erfolgt, bevor äußere Ringmodifikationen stattfinden. Dies würde bedeuten, dass Sirohäm ein Intermediat der Häm *d*₁ Biosynthese darstellt. Diese Hypothese steht in Einklang mit den Ergebnissen von Platt *et al.* (2008). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine *P. aeruginosa* *cysG*-Transposonmutante unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum auf Kaliumnitrat oder Natriumnitrit zeigt. Wie bereits diskutiert, ist das Protein CysG eine trifunktionale Sirohäm-Synthase, welche Uroporphyrinogen III zu Sirohäm umsetzt (vgl. Kapitel 2.6.1.3). Eine Deletion dieses Gens könnte also dazu führen, dass aufgrund des Fehlens des potentiellen Intermediats Sirohäm das Tetrapyrrol Häm *d*₁ nicht mehr gebildet wird und so keine aktive Nitritreduktase *in vivo* vorliegt.

Obwohl in dieser biochemischen Charakterisierung des Proteins NirJ keine Enzymaktivität feststellbar war, so konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie und Eisen- und Schwefelbestimmung gezeigt werden, dass das Protein NirJ aus *H. thermophilus* ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum besitzt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem postulierten „Radical-SAM“-Mechanismus (vgl. Kapitel 1.3.4.3).

3.2 Charakterisierung der Proteine NirDLGH aus *Pseudomonas aeruginosa*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Proteine NirDLGH aus dem *nir*-Operon von *P. aeruginosa* biochemisch und strukturell zu charakterisieren. Hierzu wurden die Proteine heterolog produziert und mittels Metallchelataffinitätschromatographie gereinigt. Durch Gelpermeationschromatographie sollte der Oligomerenstatus der Proteine analysiert und die Proteine auf Komplexbildung untereinander hin untersucht werden. Im Anschluss daran sollte ein *in vitro*-Aktivitätstest etabliert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Proteine NirDLGH eine Rolle als Transkriptionsregulatoren während der Denitrifikation spielen.

3.2.1 Präparation der Proteine NirDLGH

Wie in Kapitel 1.3.4.4 beschrieben, ist eine heterodimere oder heterotetramere Komplexbildung der Proteine NirDLGH denkbar. Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedliche Proteinpräparationsstrategien gewählt. Zum einen wurden die Proteine NirD, NirL, NirG und NirH einzeln produziert und gereinigt. Zum anderen wurde versucht, die Proteine NirD/L und NirG/H als Komplexe zu produzieren und zu reinigen. Im Anschluss daran erfolgte jeweils die Analyse des Oligomerenstatus der gereinigten Proteine mittels Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.7.5).

3.2.1.1 Produktion, Reinigung und Analyse des Oligomerenstatus der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH

Die heterologe Produktion der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH aus *P. aeruginosa* erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Dabei wurden die Proteine als

Fusionsproteine mit einem N-terminalen His₆-Tag produziert und mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Kapitel 2.6.1.1, 2.6.2 und 2.6.3) gereinigt. Die erhaltenen Protein-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) analysiert. Abbildung 17 zeigt zusammenfassend die gereinigten Proteine NirD, NirL, NirG und NirH aus *P. aeruginosa*.

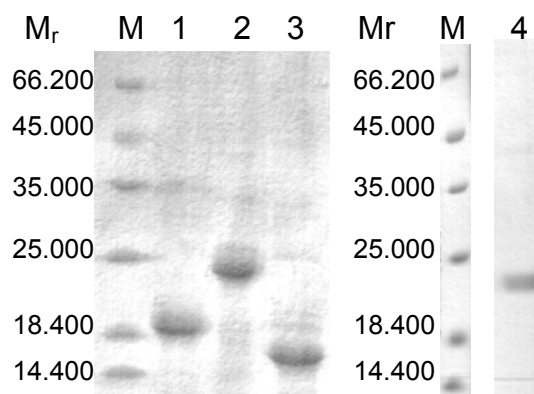


Abbildung 17: SDS-PAGE-Gel der mittels Metallchelataffinitätschromatographie gereinigten Proteine NirD, NirL, NirG und NirH aus *P. aeruginosa*. **Spur M:** 5 µl Page Ruler™ Protein Ladder, die relativen Molekularmassen (M_r) der Markerproteine sind angegeben. **Spur 1:** Gereinigtes NirD. **Spur 2:** Gereinigtes NirL. **Spur 3:** Gereinigtes NirG. **Spur 4:** Gereinigtes NirH. Die Laufhöhe der jeweiligen Proteine mit einem relativen Molekulargewicht M_r zwischen circa 15.000 und 25.000 ist deutlich erkennbar.

In Abbildung 17 sind die gereinigten Proteine NirD, NirL, NirG und NirH deutlich zu erkennen. Trotz Metallchelataffinitätschromatographie waren weitere, unerwünschte Proteine vorhanden. Die Reinheit der Proteine NirD, NirL und NirG wird auf ca. 85 % geschätzt. Die Reinheit des Proteins NirH auf ca. 95 %.

Die Proteine NirL und NirH neigten sichtbar zur Aggregatbildung und präzipitierten, unabhängig von einer Lagerung bei 4 °C, -20 °C oder -80 °C. Eine Konzentrierung (vgl. Kapitel 2.7.1) der Proteinlösung von NirL über 1,5 mg/ml war nicht möglich. Die Proteinlösung von NirH konnte auf ca. 3 mg/ml konzentriert werden, die Proteinlösungen von NirD und NirG wurden auf 5 mg/ml eingestellt. Die Proteine wurden in der Regel sofort für weiterführende Experimente verwendet. Alternativ erfolgte eine Lagerung bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

Die Proteinpräparationen lieferten eine Ausbeute von je ca. 1,5 mg NirD bzw. NirG pro Liter bakterieller Zellkultur. Die Ausbeute des Proteins NirH lag bei ca. 2,5 mg Protein pro Liter bakterieller Zellkultur, bei NirL konnten lediglich 0,8 mg pro Liter erhalten werden.

Um den Oligomerenstatus der Proteine zu untersuchen, wurden die gereinigten Proteine NirD, NirL, NirG und NirH mittels Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.7.5) analysiert. Abbildung 18 zeigt die erhaltenen Elutionsprofile.

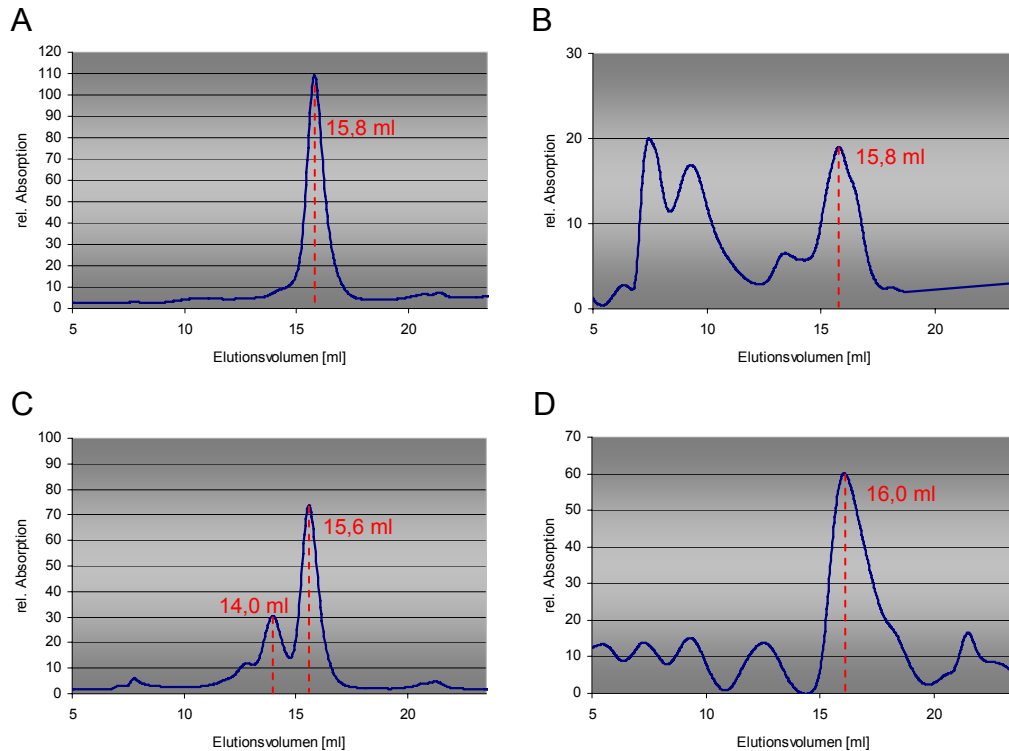


Abbildung 18: Elutionschromatogramme der isolierten Proteine NirD (A), NirL (B), NirG (C) und NirH (D) aus *P. aeruginosa*.

Es wurden je 50 µl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 1,5-5 mg/ml auf eine 10/300 Superdex 75 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit dem jeweiligen Proteinpuffer (vgl. Kapitel 2.6.1.1) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min.

Die Chromatogramme (blau dargestellt) wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die Hauptelutionspeaks sind rot markiert.

Während der analytischen Gelpermeationschromatographie zeigte sich, dass alle vier untersuchten Proteine bei einem Elutionsvolumen von ca. 15,5 bis 16 ml eluierten. Anhand einer Kalibriergerade (vgl. Kapitel 2.7.5) konnte dieses Elutionsvolumen einem relativen Molekulargewicht von ca. 36.000 bis 41.000 zugeordnet werden. Dies deutet darauf hin, dass alle vier Proteine jeweils als Homodimere vorliegen. Die analytische GPC wurde unter anaeroben Bedingungen unter Zugabe von 5 mM DTT wiederholt, wobei die gleichen Ergebnisse wie unter aeroben Bedingungen erhalten wurden. Die Dimerisierung der Einzelproteine scheint damit sauerstoffunabhängig zu sein.

Des Weiteren wurde das schon vorher beobachtete ausgeprägte Aggregationsverhalten des Proteins NirL auch in der GPC beobachtet (Abbildung 18B). Die Peaks bei einem Elutionsvolumen zwischen 7 und 12 ml entsprechen Proteinaggregaten mit einem Molekulargewicht von über 100.000. Auch das Elutionschromatogramm des Proteins NirH (Abbildung 18D) zeigte einige deutliche Peaks in diesem Bereich. Wie bereits diskutiert, neigte dieses Protein ebenfalls zur Präzipitation.

Interessanterweise zeigte das Chromatogramm des Proteins NirG (Abbildung 18C) bei einem Elutionsvolumen von ca. 14 ml einen weiteren Proteinpeak. Dieses Elutionsvolumen entspricht einem Molekulargewicht von ca. 76.000. Der Peak könnte also theoretisch ein NirG-Tetramer repräsentieren. Diese potentielle tetramere Form von NirG wurde allerdings in weiteren GPC-Läufen nicht mehr beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die durchgeführte GPC darauf hinweist, dass die Proteine NirD, NirL, NirG und NirH aus *P. aeruginosa* in Lösung als Homodimere vorliegen. Die Proteine NirD und NirG scheinen in Lösung stabiler zu sein als die Proteine NirL und NirH.

3.2.1.2 Klonierung, Produktion, Reinigung und Analyse des Oligomerenstatus der Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H

Um zu untersuchen, ob die Proteine NirD und NirL bzw. NirG und NirH gemischte Komplexe miteinander bilden, wurden die jeweiligen mittels PCR amplifizierten Gene in die Vektoren pACYCDuet-1 bzw. pETDuet-1 kloniert (vgl. Kapitel 2.5.4-7). Hierbei wurden die Restriktionsschnittstellen so gewählt, dass jeweils ein Protein (NirD bzw. NirH) mit einem N-terminalen His₆-Tag fusioniert wurde. Das jeweilige andere Protein (NirL bzw. NirG) wurde nicht mit einem Tag fusioniert. Die Wahl des Fusionsproteins erfolgte so, dass eine deutliche Trennung der Proteine auf einem 15 %igen SDS-PAGE-Gel möglich war.

Die heterologe Koproduktion der Proteine NirD/L bzw. NirG/H aus *P. aeruginosa* erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Nach der Proteinreinigung mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Kapitel 2.6.1.1, 2.6.2 und 2.6.3) wurden die erhaltenen Protein-Fractionen mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) analysiert. Im Fall einer Komplexbildung von NirD/L bzw. NirG/H wurde erwartet, dass das ungetaggte Protein mit dem getaggtten Protein kogereinigt werden kann und damit jeweils beide

Proteine in den Elutionsfraktionen vorliegen sollten. Durch die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE werden nicht-kovalente Proteinkomplexe zerstört und beide Proteine können separiert werden, so dass eine stöchiometrische Quantifizierung der Komplexkomponenten möglich wird.

Abbildung 19 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der Isolierung des Proteinkomplexes NirD/L aus *P. aeruginosa*. Abbildung 20 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der Reinigung des Proteinkomplexes NirG/H aus *P. aeruginosa*.

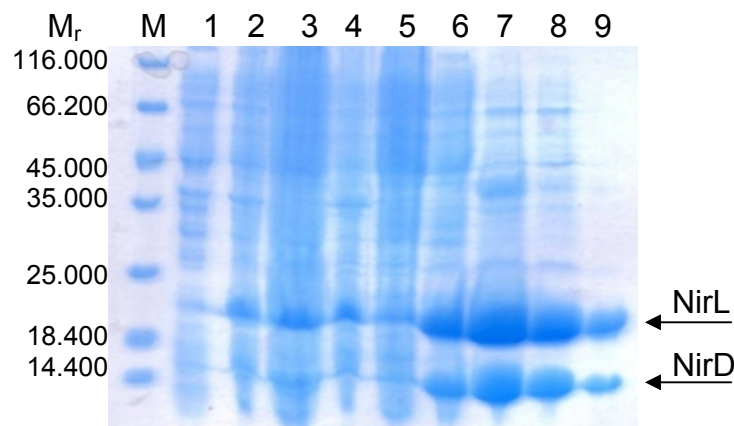


Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse der Isolierung des Proteinkomplexes NirD/L aus *P. aeruginosa*.

Spur M: 5 µl Page Ruler™ Protein Ladder, die relativen Molekularmassen (M_r) der Markerproteine sind angegeben. **Spur 1:** Proteine einer bakteriellen Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 0 h bei Induktion. **Spur 2:** Proteine einer Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 4 h nach Induktion. **Spur 3:** Unlösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 4:** Lösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 5:** Proteine im Durchlauf der Metallchelataffinitätschromatographie. **Spur 6-8:** Proteine der Waschfraktionen. **Spur 9:** Proteine der Elutionsfraktion der Metallchelataffinitätschromatographie.

Die Laufhöhe der gewünschten Proteine mit einem relativen Molekulargewicht M_r von circa 14.000 (NirD) und 19.000 (NirL) ist mit Pfeilen markiert.

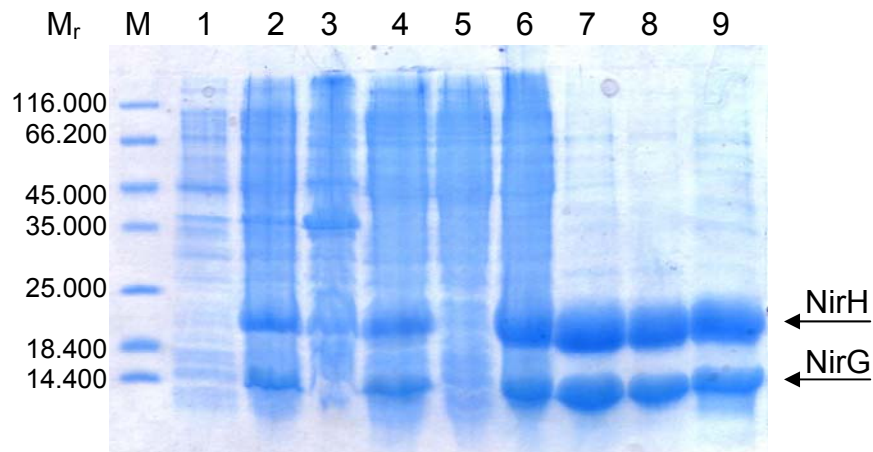


Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse der Isolierung des Proteinkomplexes NirG/H aus *P. aeruginosa*.

Spur M: 5 µl Page Ruler™ Protein Ladder, die relativen Molekularmassen (M_r) der Markerproteine sind angegeben. **Spur 1:** Proteine einer bakteriellen Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 0 h bei Induktion. **Spur 2:** Proteine einer Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 20 h nach Induktion. **Spur 3:** Unlösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 4:** Lösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 5:** Proteine im Durchlauf der Metallchelataffinitätschromatographie. **Spur 6-8:** Proteine der Waschfraktionen. **Spur 9:** Proteine der Elutionsfraktion der Metallchelataffinitätschromatographie.

Die Laufhöhe der gewünschten Proteine mit einem relativen Molekulargewicht M_r von circa 14.000 (NirG) und 20.000 (NirH) ist mit Pfeilen markiert.

In beiden Abbildungen ist deutlich erkennbar, dass die Elutionsfraktion (Spur 9) jeweils beide Proteine enthielt, obwohl nur ein Protein (NirD bzw. NirH) mit einem His₆-Tag fusioniert war. Die Identität der gereinigten Proteine als NirD und NirL bzw. NirG und NirH wurde mittels Westernblot und anschließender N-terminaler Sequenzierung (vgl. Kapitel 2.7.3 und 2.7.4) bestätigt. Durch die erfolgreiche Koreinigung der Proteine konnte also eine Interaktion zwischen NirD und NirL bzw. NirG und NirH gezeigt werden. Da die Proteine in annähernd äquimolaren Mengen vorlagen, kann von einer 1:1-Stöchiometrie in den NirD/L bzw. NirG/H Komplexen ausgegangen werden. In den Waschfraktionen (Spuren 6-8) waren die gewünschten Proteine bereits in großen Mengen vorhanden, was auf eine zu hohe Imidazolkonzentration im Waschpuffer hindeutet. Die gereinigten Proteinkomplexe wurden entsalzt (Kapitel 2.6.4) und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde auf ca. 95 % geschätzt. Die Präparation lieferte eine Ausbeute von ca. 10 mg NirD/L bzw. 15 mg NirG/H pro Liter Zellkultur.

Um den Oligomerenstatus der Proteinkomplexe zu untersuchen, wurden die gereinigten Komplexe NirD/L und NirG/H mittels analytischer Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.7.5) analysiert (Abbildung 21).

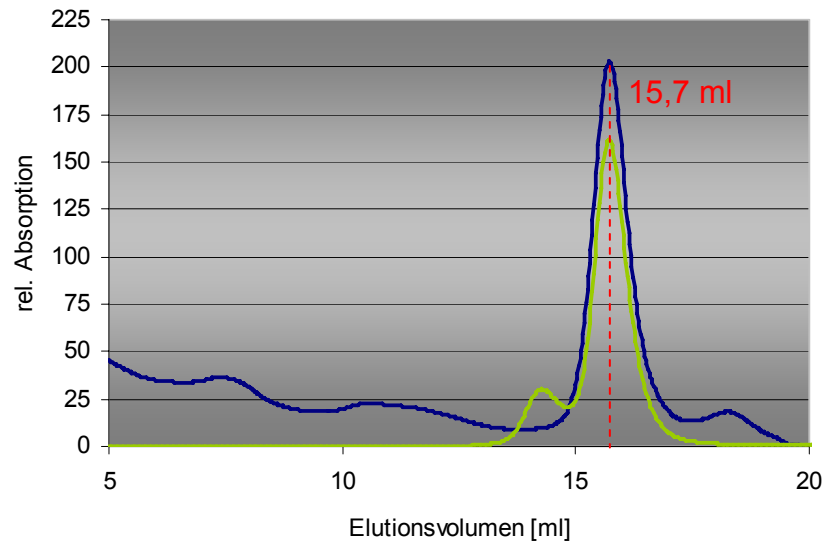


Abbildung 21: Elutionschromatogramme der isolierten Proteinkomplexe NirD/L (blau), und NirG/H (grün) aus *P. aeruginosa*.

Es wurden je 100 µl einer Proteinelösung mit einer Konzentration von ca. 5 mg/ml auf eine 10/300 Superdex 75 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit dem jeweiligen Proteinpuffer (vgl. Kapitel 2.6.1.1) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min.

Die Chromatogramme (blau bzw. grün dargestellt) wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die Hauptelutionspeaks sind rot markiert.

Es ist deutlich erkennbar, dass beide Proteinkomplexe (NirD/L bzw. NirG/H) bei einem Elutionsvolumen von ca. 15,7 ml eluierten. Anhand einer Kalibriergerade (vgl. Kapitel 2.7.5) wurde dieses Elutionsvolumen einem relativen Molekulargewicht von ca. 38.500 zugeordnet. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den vorliegenden Proteinkomplexen um Heterodimere handelt. Der gereinigte Proteinkomplex NirD/L neigte zur Präzipitation, war jedoch deutlich stabiler als das Einzelprotein NirL. Der Proteinkomplex NirG/H wies eine gute Löslichkeit auf und war ebenfalls deutlich stabiler als das Einzelprotein NirH. Die analytische GPC wurde unter anaeroben Bedingungen wiederholt, wobei die gleichen Ergebnisse erhalten wurden wie unter aeroben Bedingungen. Der heterodimere Oligomerenstatus der Komplexe scheint damit sauerstoffunabhängig zu sein. Eine Tetramerbildung konnte unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet werden.

Der Nachweis der heterodimeren NirD/L und NirG/H Komplexe ist sehr interessant, da in Kapitel 3.2.1.1 gezeigt wurde, dass die gereinigten Einzelproteine als Homodimere vorlagen.

Aufgrund der Beobachtung von unterschiedlichen Formen der NirDLGH Proteine wäre es denkbar, dass die unterschiedlichen Komplexe unterschiedliche Funktionen *in vivo* haben. Wie in Kapitel 1.3.4.4 beschrieben, ist sowohl eine enzymatische Funktion (die Decarboxylierung der Acetatgruppen an den Position C12 und C18) als auch eine genregulatorische Funktion (als Transkriptionsfaktoren) postuliert. Möglicherweise liegen in *P. aeruginosa* sowohl die homodimeren als auch die heterodimeren Formen der Proteine vor und erfüllen dann je eine unterschiedliche Funktion. In der vorliegenden Arbeit wurden beide mögliche Funktionen experimentell untersucht. Alternativ wäre denkbar, dass es sich bei den homodimeren Einzelproteinen um Artefakte handelt, die in *E. coli* entstehen, weil der natürliche Komplexpartner nicht vorlag. Dies könnte in der hohen Homologie der Proteine untereinander begründet sein. Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass die heterodimeren Proteinkomplexe in Lösung wesentlich stabiler sind als die Einzelproteine NirL bzw. NirH.

3.2.2 Untersuchung der enzymatischen Aktivität der Proteine NirDLGH

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität der Proteine NirDLGH wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen wurde getestet, ob Precorrin-2 oder dessen oxidierte Form Sirohydrochlorin als Substrat für die Decarboxylierung durch NirDLGH dienen können. Zum anderen wurde geprüft, ob eine Umsetzung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm erfolgen kann. Hierzu musste Sirohäm zuerst aus Proteinen isoliert werden, die dieses Tetrapyrrol produzieren bzw. als Kofaktor beinhalten.

3.2.2.1 Klonierung, Produktion und Reinigung des Proteins CysG aus *Escherichia coli*

Um das postulierte Substrat Sirohäm zu isolieren, wurde das Sirohäm produzierende Protein CysG aus *E. coli* gewählt. Bei dem Protein CysG handelt es sich um eine

trifunktionelle Sirohäm-Synthase, bestehend aus einer Domäne mit Precorrin-2-Dehydrogenase- und Eisenchelataase-Aktivität sowie einer Domäne mit Uroporphyrinogen III-Methyltransferase-Aktivität. Für die rekombinante Produktion wurde das mittels PCR amplifizierte *cysG*-Gen in den Vektor pETDuet-1 kloniert (vgl. Kapitel 2.5.4-7).

Die homologe Produktion des Proteins CysG aus *E. coli* erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Die Reinigung von CysG erfolgte mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Kapitel 2.6.1.1, 2.6.2 und 2.6.3). Die erhaltenen Protein-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) analysiert. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Präparation des Proteins CysG aus *E. coli*.

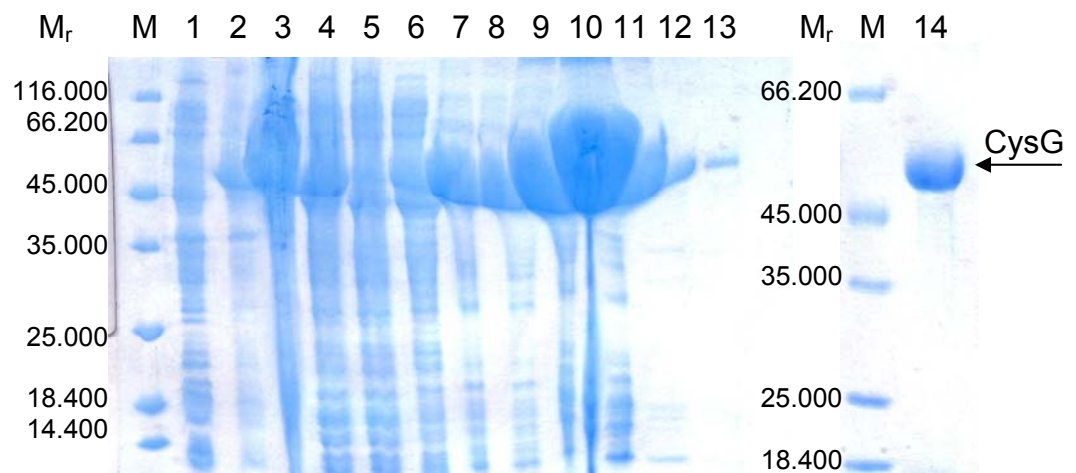


Abbildung 22: SDS-PAGE-Analyse der Präparation des Proteins CysG aus *E. coli* mittels Metallchelataffinitätschromatographie.

Spur M: 5 µl Page Ruler™ Protein Ladder, die relativen Molekularmassen (M_r) der Markerproteine sind angegeben. **Spur 1:** Proteine einer bakteriellen Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 0 h bei Induktion. **Spur 2:** Proteine einer Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 20 h nach Induktion. **Spur 3:** Unlösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 4:** Lösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 5:** Proteine im Durchlauf der Metallchelataffinitätschromatographie. **Spur 6-9:** Proteine der Waschfraktionen. **Spur 10-13:** Proteine der Elutionsfraktionen der Metallchelataffinitätschromatographie. **Spur 14:** Vereinigte Eluate, konzentriertes Protein CysG.

Die Laufhöhe des gewünschten Proteins mit einem relativen Molekulargewicht M_r von circa 50.000 ist mit einem Pfeil markiert.

Es ist deutlich erkennbar, dass eine erhebliche Menge an Protein unlöslich vorlag (Spur 3). Ein großer Anteil des Proteins befand sich jedoch auch löslich im zellfreien Extrakt. In den Waschfraktionen (Spuren 6-9) wurden zunehmend weniger unerwünschte Proteine eluiert, so dass von einem ausreichenden Waschschrift

ausgegangen werden konnte. Es ist jedoch deutlich sichtbar, dass bereits in den Waschfraktionen CysG verloren wird. Da die Ausbeute des Proteins CysG mit einem relativen Molekulargewicht von circa 50.000 sehr hoch war (Elutionsfraktionen Spuren 10-13), wurde der Verlust toleriert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, auf 10 mg/ml konzentriert, gegen ddH₂O umgepuffert (Kapitel 2.6.4) und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Reinheit des gereinigten CysG wurde auf ca. 99 % geschätzt. Die Ausbeute betrug 20 mg pro Liter Zellkultur.

3.2.2.2 Produktion und Reinigung des Proteins NirA aus *Mycobacterium tuberculosis*

Eine weitere Möglichkeit, das Tetrapyrrol Sirohäm zu isolieren, besteht in dessen Extraktion aus einem Protein, welches Sirohäm als Kofaktor enthält. Für diesen Zweck wurde das Protein NirA aus *Mycobacterium tuberculosis* gewählt. Bei NirA handelt es sich um eine Ferredoxin-abhängige Nitritreduktase, die neben einem Eisen-Schwefel-Zentrum auch Sirohäm als Kofaktor enthält.

Die heterologe Produktion des Proteins NirA aus *M. tuberculosis* erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Das rekombinante NirA trug einen His₆-Tag und wurde mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Kapitel 2.6.1.1, 2.6.2 und 2.6.3) gereinigt. Die erhaltenen Protein-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) analysiert (Abbildung 23).

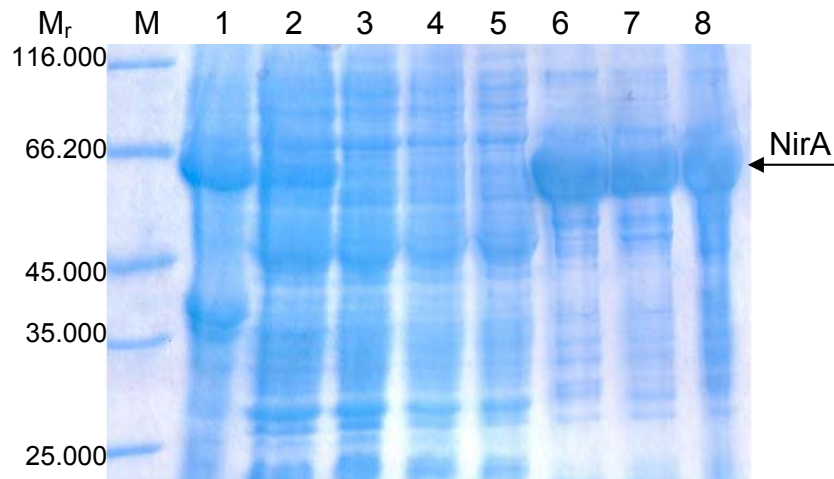


Abbildung 23: SDS-PAGE-Gel der Reinigung des Proteins NirA aus *M. tuberculosis* mittels Metallchelataffinitätschromatographie.

Spur M: 5 µl Page Ruler™ Protein Ladder, die relativen Molekularmassen (M_r) der Markerproteine sind angegeben. **Spur 1:** Proteine einer bakteriellen Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 0 h bei Induktion. **Spur 2:** Proteine einer Zellkulturprobe ($0,6 \times 10^9$ Zellen) zum Zeitpunkt 20 h nach Induktion. **Spur 3:** Unlösliche Proteine nach der Ultrazentrifugation. **Spur 4-5:** Proteine der Waschfraktionen. **Spur 6-8:** Proteine der Elutionsfraktionen der Metallchelataffinitätschromatographie.

Die Laufhöhe des gewünschten Proteins mit einem relativen Molekulargewicht M_r von circa 60.000 ist mit einem Pfeil markiert.

Das Protein NirA befand sich eindeutig erkennbar in den Elutionsfraktionen (Spur 6-8). Das Eluat war deutlich braun-rötlich gefärbt, was auf das Vorhandensein von Eisen-Schwefel-Zentren und Sirohäm hinweist. Das Eluat war jedoch auch noch deutlich mit anderen Proteinen verunreinigt. Möglicherweise lag dies an der Tatsache, dass die Elution des Proteins NirA bereits mit 50 mM Imidazol im Proteinpuffer erfolgte. Folglich wurden die Waschschrte nur mit 20 mM Imidazol durchgeführt. Da das Protein NirA lediglich für die Extraktion des Kofaktors Sirohäm gebraucht wurde, wurden die Verunreinigungen toleriert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, auf 10 mg/ml konzentriert und im Anschluss an die Reinigung mit Metallchelataffinitätschromatographie gegen ddH₂O umgepuffert (Kapitel 2.6.4).

Die Reinheit des Proteins NirA wurde auf ca. 40 % geschätzt. Die Ausbeute betrug 15 mg NirA pro Liter bakterieller Zellkultur.

3.2.2.3 Extraktion des Kofaktors Sirohäm

Durch die Zugabe von 10 % TCA zu den gereinigten Proteinen CysG und NirA aus Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2 fiel ein bräunliches Präzipitat aus. Nach der Zentrifugation war der Überstand rot gefärbt. Durch die anschließende Isolierung des Sirohäms nach Gädke (2011) erhielt man eine rot gefärbte Lösung. Die Ausbeute der Sirohäm-Isolierung war bei Verwendung des Proteins NirA deutlich höher als bei dem Protein CysG, so dass alle weiterführenden Experimente mit dem aus NirA isolierten Sirohäm durchgeführt wurden. Das aus NirA extrahierte Sirohäm wurde mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie sowie Massenspektrometrie untersucht.

3.2.2.4 UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Kofaktors Sirohäm

Die rötliche Sirohäm-Lösung wurde mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht (Kapitel 2.8.2-3). Abbildung 24 zeigt das UV/Vis-Spektrum des isolierten Tetrapyrrols Sirohäm.

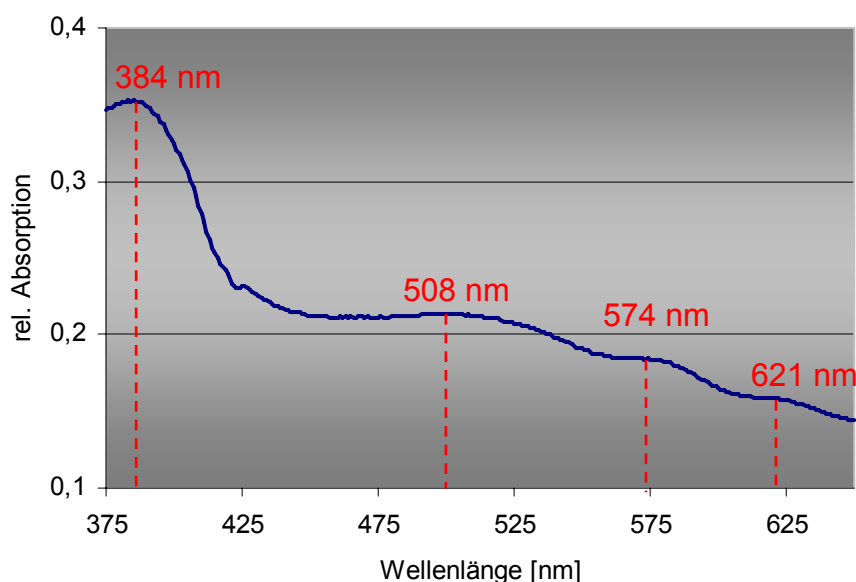


Abbildung 24: UV/Vis-Spektrum des extrahierten Tetrapyrrols Sirohäm in wässriger 2,5 %iger TCA-Lösung. Das Spektrum (blau dargestellt) wurde unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Im Bereich bei 384 nm, 508 nm, 574 nm und 621 nm sind Absorptionsmaxima sichtbar (rot markiert).

Deutlich erkennbar sind Absorptionsmaxima bei 384, 508, 574 und 621 nm. Dieses Spektrum steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Spektren für Sirohäm (Siegel *et al.*, 1973, Hirasawa-Soga *et al.*, 1983). Besonders die ausgeprägte Soret-Bande bei 384 nm und die schwach ausgeprägten α -, β -, und γ -Banden deuten auf Sirohäm als isoliertes Tetrapyrrol hin.

Das Fluoreszenzspektrum lieferte bei einer Anregungswellenlänge zwischen 350 nm und 425 nm kein Emissionsmaximum. Dieses Ergebnis steht ebenfalls in Einklang mit den biophysikalischen Eigenschaften des Tetrapyrrols Sirohäm (Hirasawa-Soga *et al.*, 1983), da durch den Einbau des Zentralmetallions Eisen die Fluoreszenzeigenschaft des Tetrapyrrols verloren geht.

Diese beiden spektroskopischen Analysen waren ein erster Hinweis darauf, dass der Kofaktor Sirohäm in seiner natürlichen Form gereinigt wurde.

Abbildung 25 zeigt das in der Literatur beschriebene Tetrapyrrol Sirohäm (Hirasawa-Soga *et al.*, 1983).

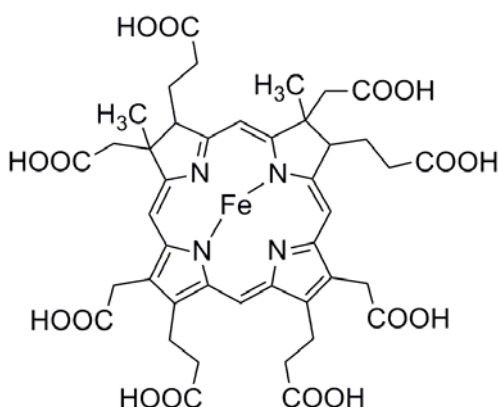


Abbildung 25: Struktur des Tetrapyrrols Sirohäm.
Die theoretisch exakte Masse des Sirohäms beträgt 916,21 g/mol.

Eine detaillierte Analyse des isolierten Sirohäm erfolgte mittels Massenspektrometrie.

3.2.2.5 Massenspektrometrische Untersuchung des Kofaktors Sirohäm

Da die isolierte Sirohäm-Lösung (Kapitel 3.2.2.3) für massenspektrometrische Untersuchungen in der vorliegenden Form nicht geeignet war, wurden HPLC-MS-Experimente in Kooperation mit Dipl.-Chem. Alexander Neumann (Institut für Organische Chemie) durchgeführt. Die verwendete HPLC-Methode, die Laufmittel

und die Säule waren dabei analog zu der in Kapitel 2.8.4 beschriebenen etablierten Methode.

Abbildung 26 zeigt das erhaltene HPLC-Chromatogramm sowie die detektierten Masse-Daten zum Zeitpunkt $t = 5,46$ min.

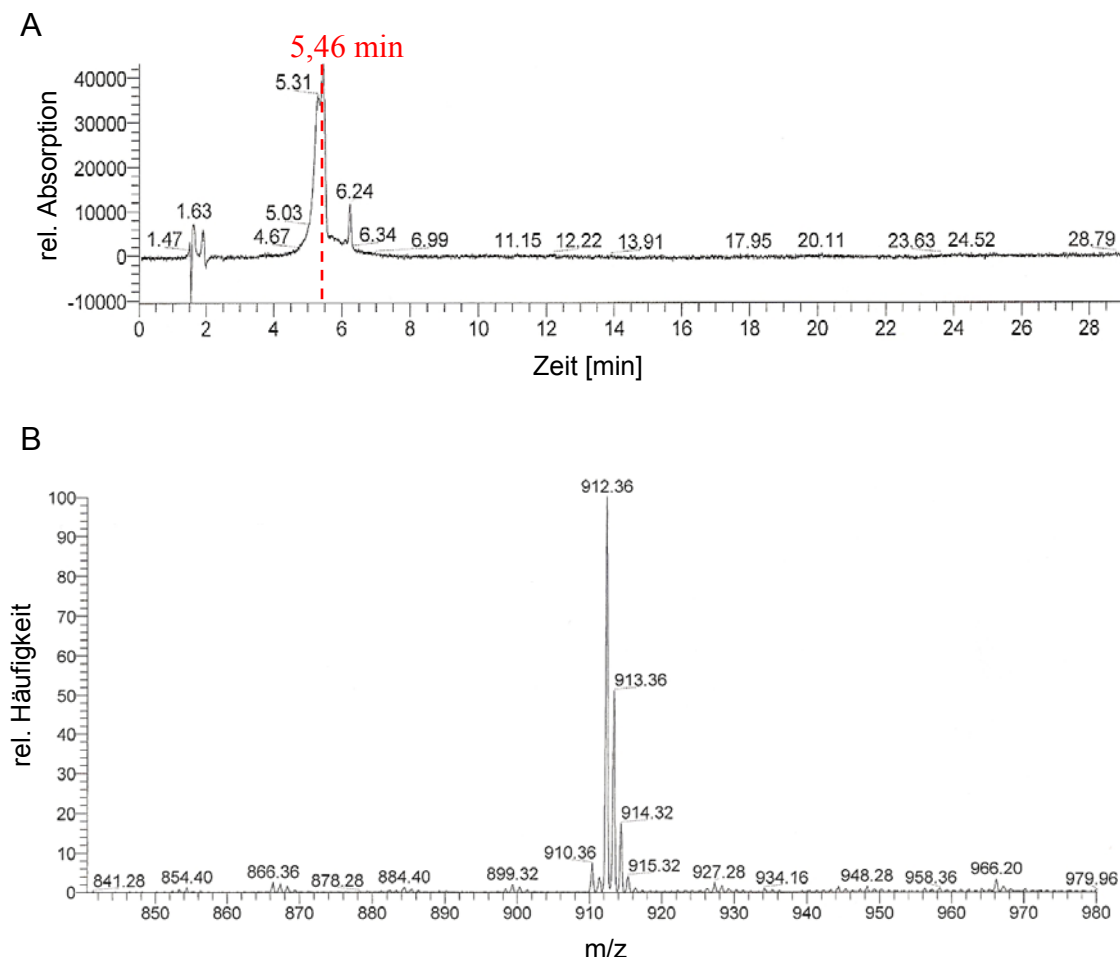


Abbildung 26: a) Chromatogramm der HPLC-MS-Analyse des isolierten Sirohäms. b) Massenspektrum der Substanzen im Elutionspeak bei $t = 5,46$ min, aufgenommen im positiven Modus.

a) Deutlich erkennbar sind die Elutionspeaks bei 5,31, 5,46 und 6,24 min. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 385 nm. Rot markiert ist der dominierende Peak bei 5,46 min. Das UV/Vis-Spektrum der Substanz, die in diesem Peak eluiert wurde, zeigte die für Sirohäm typischen Charakteristika wie in Abbildung 24. b) Dargestellt ist das Massenspektrum der Substanz, die zum Zeitpunkt $t = 5,46$ min eluierte. Zu beobachten ist das Signal einer dominanten Molekülspezies mit $m/z = 911,36$ ($M+H^+ = 912,36$). Nahezu keine weiteren Molekülspezies wurden im untersuchten Massenbereich detektiert.

Deutlich erkennbar in Abbildung 26a ist das Vorhandensein eines dominierenden Elutionspeaks im HPLC-Chromatogramm bei 5,46 min. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass es sich hierbei wahrscheinlich um zwei, nicht per Basislinie getrennte, Peaks handelt. Des Weiteren wurde ein weiterer kleinerer Elutionspeak bei circa

6,24 min detektiert. Die Auswertung der zu den jeweiligen Elutionspeaks gehörenden Masse-Spektren ergab zu allen drei genannten Zeitpunkten das Vorliegen eines Moleküls mit der Masse $m/z = 911,36$ ($M+H^+ = 912,36$). Die Peaks bei 5,31 min und 6,24 min enthielten darüber hinaus weitere Moleküle, deren Massenspektren deutlich schwächer ausgeprägt waren mit Massen von 866,32; 899,36; 927,38; 941,32; 956,32 und 966,20 u. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Derivate der Molekülspezies mit der Masse $m/z = 911,36$. Abbildung 26b zeigt die massenspektrometrischen Daten der Substanz die zum Zeitpunkt $t = 5,46$ min eluierte. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass nur eine Molekülspezies mit der Masse 911,4 detektiert wurde. Die erwartete Masse des Tetrapyrrols Sirohäm liegt jedoch bei 916,2. Für Tetrapyrrole der Isobakteriochlorin-Klasse ist jedoch die Ausbildung von Lactonformen in der Literatur beschrieben (Battersby *et al.*, 1977). Abbildung 27 zeigt die theoretisch möglichen Sirohäm-Lactonformen.

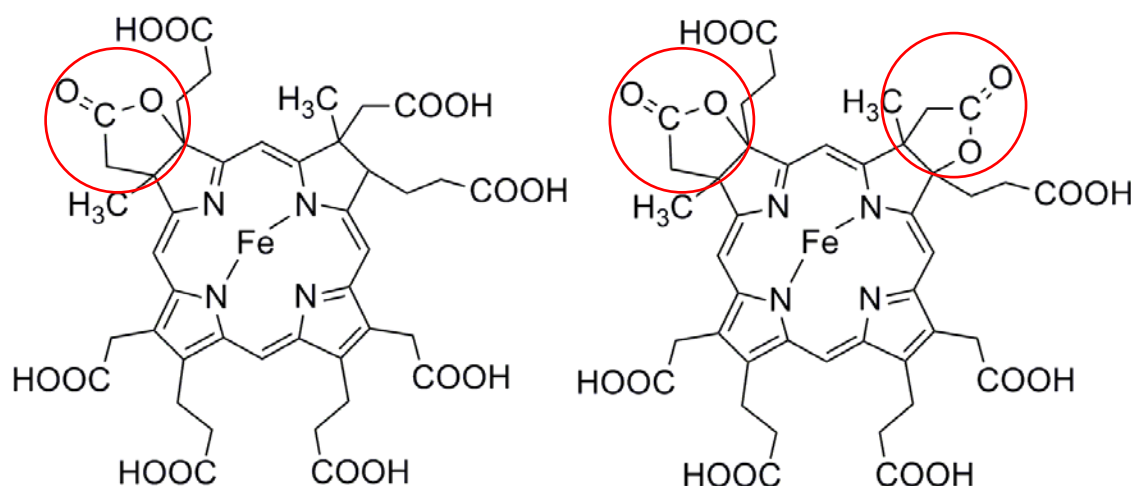


Abbildung 27: Struktur der theoretisch möglichen Lactonformen von Sirohäm. Für Sirohäm ist eine monolactonform (links) mit der Masse $M = 914,2$ und eine Dilactonform (rechts) mit der Masse $M = 912,2$ denkbar. Die zyklischen Lactonringe sind rot markiert.

Die gemessene Masse von 911,4 entspricht somit nahezu der theoretisch berechneten Masse der Dilactonform des Sirohäms. Dennoch besteht eine Massendifferenz von ca. 1 u. Es ist durchaus denkbar, dass eine der Propionatseitenketten an Ring C bzw. D an der Koordination des Zentralions beteiligt ist. Dies würde zu dem Verlust eines H^+ -Ions führen, was die Massendifferenz von ca. 1 u erklären würde.

Da sich das theoretisch berechnete Massenspektrum und das gemessene Massenspektrum in ihrem Isotopenmuster gleichen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem vorliegenden Tetrapyrrol um den Kofaktor Sirohäm handelte. Dieses Sirohäm lag jedoch in der Dilactonform vor. Eine noch exaktere Charakterisierung der vorliegenden Substanz wäre nur durch NMR-Spektroskopie möglich gewesen. Die isolierte Menge der Substanz war jedoch für diese Art von Experimenten zu gering.

Das isolierte und charakterisierte Sirohäm-Dilacton wurde für Enzymaktivitätstests eingesetzt.

3.2.2.6 Decarboxylierung von Sirohydrochlorin zu 12,18-Didecarboxysirohydrochlorin

Hypothesen zur enzymatischen Funktion der Proteine NirDLGH besagen, dass diese die Decarboxylierung von Sirohydrochlorin zu 12,18-Didecarboxysirohydrochlorin katalysieren könnten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der Enzymaktivitätstest nach Storbeck *et al.* (2009), wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, modifiziert.

In einem Endvolumen von 500 µl wurden 1 mM ALA, 0,14 µM HemB aus *P. aeruginosa*, 0,15 µM HemC aus *Bacillus megaterium* und 0,17 µM HemD aus *B. megaterium* (Frankenberg *et al.*, 1998 und Raux *et al.*, 2003), 1,5 µM NirE aus *P. aeruginosa* (Storbeck *et al.*, 2009) und 200 µM SAM in Enzymassaypuffer vermischt und für 4 h bei 37 °C und Dunkelheit inkubiert. Die Oxidation von Precorrin-2 zu Sirohydrochlorin erfolgte durch Zugabe von 1,5 µM SirC aus *B. megaterium* und 100 µM NAD⁺. Nach Zugabe der Proteine NirDLGH, NirD/L, NirG/H oder der Einzelproteine NirD, NirL, NirG bzw. NirH wurde jedoch keine Veränderung im UV/Vis-Spektrum (Kapitel 2.8.2), Fluoreszenzspektrum (Kapitel 2.8.3) oder HPLC-Chromatogramm (Kapitel 2.8.4) im Vergleich zu den Testmischungen ohne diese Proteine beobachtet. In allen Test-Ansätzen wurde jedoch jeweils das enzymatisch aus ALA gebildete Sirohydrochlorin nachgewiesen.

Eine von den Proteinen NirDLGH katalysierte Decarboxylierungsreaktion ausgehend von Sirohydrochlorin konnte demnach nicht gezeigt werden. Es wäre denkbar, dass die Reaktion nicht stattfinden konnte, weil ein essentieller Kofaktor fehlte oder unpassende Reaktionsbedingungen gewählt wurden. Des Weiteren ist es möglich,

dass für die Biosynthese des Häm d_1 ein Multiproteinkomplex nötig ist, um die Zelle nicht den stark reaktiven, freien Tetrapyrrolen auszusetzen, um Zellschädigungen zu vermeiden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich bei Sirohydrochlorin nicht um das Substrat für die Proteine NirDLGH handelt und deshalb keine Umsetzung beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 3.1.2).

3.2.2.7 Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm

Prof. Dr. M. J. Warren und Prof. Dr. S. J. Ferguson postulierten 2010 zusammen (nicht publiziert), dass die NirDLGH-Homologe aus *P. denitrificans* die Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm katalysieren. Diese Hypothese steht in Einklang mit den Resultaten von Platt *et al.* (2008), die besagen, dass eine *P. aeruginosa* *cysG*-Mutante keine anaerobe Nitratatmung mehr durchführen kann. Um zu untersuchen, ob die Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* dieselbe Reaktion katalysieren, wurde ein Enzymaktivitätstest nach Kapitel 2.8.2 etabliert. Hierbei wurde das isolierte Sirohäm aus Kapitel 3.2.2.5 als Substrat eingesetzt.

Abbildung 28 zeigt das HPLC-Chromatogramm von isoliertem Sirohäm, wobei die Detektion durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 385 nm erfolgte.

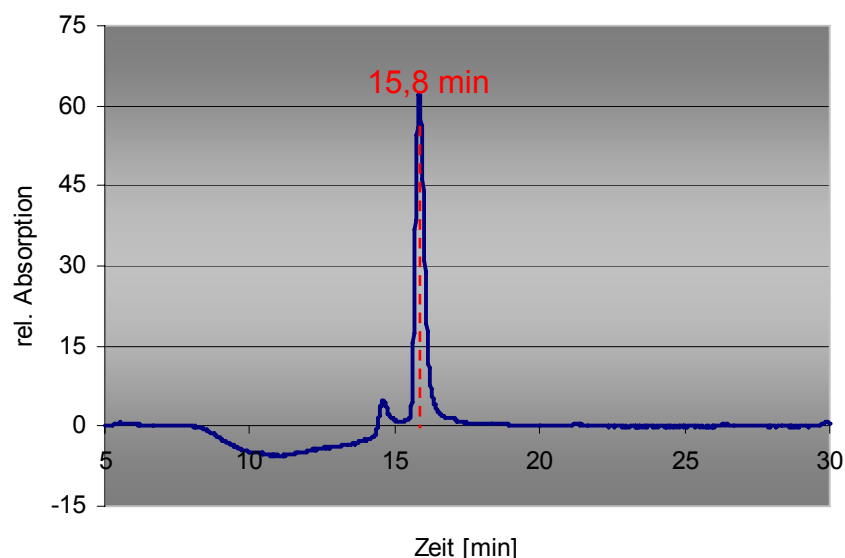


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm von Sirohäm (Kapitel 3.2.2.5). Blau dargestellt ist das HPLC-Chromatogramm, die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 385 nm. Rot markiert ist der Hauptelutionspeak bei 15,8 min. Das Totvolumen von ca. 5 min wurde aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt.

Deutlich erkennbar ist der dominierende Elutionspeak bei 15,8 min. Das UV/Vis-Spektrum der zu diesem Zeitpunkt eluierenden Substanz war identisch mit dem in Kapitel 3.2.2.4 für Sirohäm beschriebenen. Für die eluierende Substanz (15,8 min) wurde keine Fluoreszenz detektiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieser Peak im HPLC-Chromatogramm dem Tetrapyrrol Sirohäm bzw. seiner Dilactonform entspricht.

Die HPLC-Chromatogramme der Enzymaktivitätstest, welche die Proteine NirDLGH, NirD/L, NirG/H oder die Einzelproteine NirD, NirL, NirG bzw. NirH enthielten, zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu dem in Abbildung 28 gezeigten Chromatogramm. In allen Ansätzen wurde jeweils das eingesetzte Sirohäm nachgewiesen.

Eine durch die Proteine NirDLGH katalysierte Decarboxylierungsreaktion ausgehend von Sirohäm konnte demnach nicht gezeigt werden. Wie bereits für die Decarboxylierung von Sirohydrochlorin diskutiert, wäre es denkbar, dass die Reaktion nicht stattfinden konnte, weil ein essentieller Kofaktor fehlte oder unpassende Reaktionsbedingungen gewählt wurden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass, sofern Sirohäm wirklich das Substrat für die Proteine NirDLGH darstellt, die für diese Tests eingesetzte Dilactonform des Sirohäms die Substraterkennung erschwerte oder gänzlich verhinderte. Die Dilactonform ist im Vergleich zur freien Säureform des Sirohäms in den Bereichen um Ring A und Ring B deutlich hydrophober. Diese strukturellen Veränderungen könnten die Bindung des Dilactons des Sirohäm im aktiven Zentrum der Proteine NirDLGH verhindern, sofern diese wirklich, wie postuliert, die oben beschriebene Reaktion katalysieren.

Eine enzymatische Herstellung des Sirohäms im Enzymtestgemisch durch das Multifunktionsenzym CysG (vgl. Kapitel 3.2.2.1) wurde ebenfalls versucht. Dieser Ansatz scheiterte an dem komplexen Eiseneinbau, da zu hohen Konzentrationen an Eisen die übrigen katalytischen Funktionen von CysG hemmen. Vergleichbare Experimente mit Eisenchelatasen sind selten beschrieben, häufig wird auf andere zweiwertige Metalle, wie Kobalt oder Nickel, ausgewichen, um die Chelataseaktivität eines Enzyms nachzuweisen. Da jedoch *in vivo* Eisen als Zentralion zwingend für die Häm *d*₁-Biosynthese erforderlich ist, konnte keine alternative Lösung gefunden werden. Unter Umständen könnte *in vitro* die Zugabe von Kobaltverbindungen eine Lösung dieses Problems darstellen.

3.2.3 Charakterisierung der Proteine NirDLGH als Transkriptionsregulatoren

Da den Proteinen NirDLGH aus *P. aeruginosa* in dieser Arbeit keine enzymatische Funktion zugeordnet werden konnte, sollte deren potentielle Rolle als Transkriptionsfaktoren näher untersucht werden. Aufgrund von bioinformatischen Aminosäuresequenzanalysen und initialen DNA-Protein-Bindungsstudien (Xiong *et al.*, 2007) wurde vermutet, dass die Proteine NirDLGH zur Transkriptionsregulatorfamilie des AsnC/Lrp-Typs gehören und eventuell die Transkription des *nirJ*-Gens regulieren könnten. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob ein Transkriptionsstartpunkt innerhalb des *P. aeruginosa nir*-Operons vorliegt. Im Anschluss daran sollte die identifizierte Promotorregion mittels *lacZ*-Reportergernefusionen, Gelretardationsanalysen und DNaseI-Protektionsanalysen detailliert beschrieben werden.

3.2.3.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *nirJEN*

Auf Grund der in Kapitel 1.3.4.4 beschriebenen bioinformatischen Vorhersagen und der Arbeiten von Xiong *et al.* (2007) wurde angenommen, dass die Proteine NirDLGH in *P. aeruginosa* die Expression der Gene *nirJEN* regulieren könnten. Falls dies der Fall wäre, so müsste *upstream* von *nirJ* ein stabiles 5'-mRNA-Ende detektierbar sein. Experimentell wurde hierzu eine Primer-Extension-Analyse durchgeführt. Nach Präparation der Gesamtzell-RNA aus anaerob mit Nitrat gewachsenen *P. aeruginosa*-Kulturen (Kapitel 2.4.2), wurde eine reverse Transkription zur Bestimmung des potentiellen Transkriptionsstartpunktes von *nirJ* mit dem Oligonukleotid oJW1 durchgeführt (Kapitel 2.5.12). Mit diesem DIG-markierten Oligonukleotid wurde ebenfalls eine Sequenzierreaktion mit dem Plasmid pHAP1, welches ein Fragment des *nir*-Operons enthält, als Templat angesetzt (Kapitel 2.5.11). Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der Primer-Extension-Analyse.

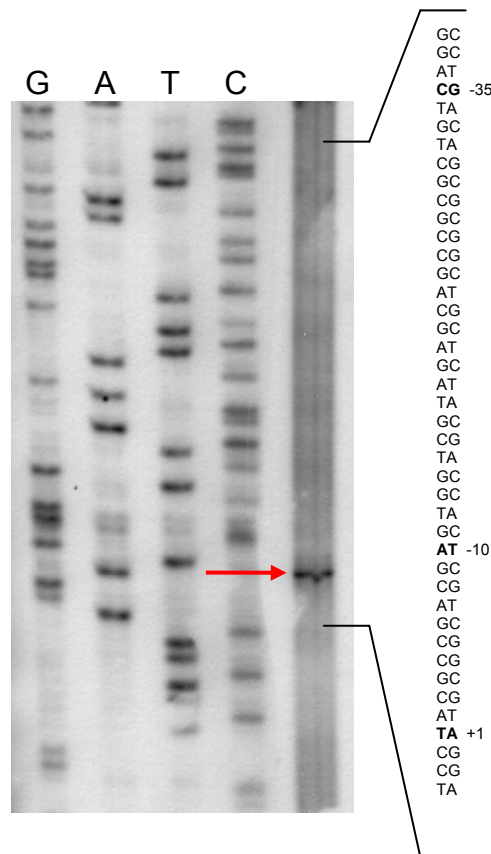


Abbildung 29: Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts *upstream* des Gens *nirJ*. Dargestellt ist die Primer-Extension-Analyse von *nirJEN*. Deutlich erkennbar ist das Vorhandensein einer distinkten Bande (roter Pfeil). Diese Bande stellt ein stabiles 5'-mRNA-Ende dar und definiert den Transkriptionsstartpunkt *upstream* des Gens *nirJ*. Rechts abgebildet ist die Sequenz. Der Transkriptionsstart befindet sich auf Höhe eines Thymidins (+1). Die -10- und -35-Regionen sind angegeben. Die Sequenzierreaktion, durchgeführt mit dem Oligonukleotid oJW1, ist mit den Basen-Abkürzungen G, A, T und C markiert.

In der Primer-Extension-Analyse ist eine distinkte Bande (roter Pfeil) deutlich erkennbar. Durch die parallel aufgetragene Sequenzierreaktion wurde diese Bande auf Höhe eines Thymidins dem Transkriptionsstartpunkt *upstream* von *nirJ* zugeordnet. Dieser erstmals detektierte Transkriptionsstartpunkt befindet sich 42 bp *upstream* von *nirJ*. Dieser Befund war der erste Hinweis darauf, dass innerhalb des *nir*-Operons in *P. aeruginosa* eine zusätzliche, bisher unbekannte Promotorregion vorliegt, was auf eine Feinregulierung der Häm *d*₁-Biosynthese hindeuten könnte. Abbildung 30 veranschaulicht das Ergebnis der Primer-Extension-Analyse schematisch und ordnet den entdeckten Transkriptionsstartpunkt in den genomischen Kontext der Gene *nirJEN* ein.


```

CGAAGGCTATCGCCAGCAGATCCGCC
TGCTGCTCGGCGAGGACTGTCGCGCC
GACGAGATGCTGGTGAGCAGCCGCAT+1
CCTGAAGAAGACCGGCCTGCGCCTGG
CGCAGAAGGAGGAACGTCCATG-nirJ
      RBS           Start nirJ
-nirE-nirN-Terminator

```

Abbildung 30: Schematische Darstellung der hypothetischen Promotorregion *upstream* der Gene *nirJEN*.

Die dargestellte DNA-Sequenz zeigt die 130 bp *upstream*-Region des *nirJ*-Gens aus *P. aeruginosa*. Der durch die Primer-Extension-Analyse bestimmte Transkriptionsstart, die -10 und die -35-Region sind rot markiert. Blau hervorgehoben ist das Start-ATG des Gens *nirJ*, grün unterstrichen die Ribosomenbindestelle (RBS).

Die hier bestimmte potentielle *nirJ*-Promotorregion (-10 und -35-Region) besitzt kaum Sequenzhomologien zu den in der Literatur beschriebenen *P. aeruginosa*-Promotoren, was auf einen schwachen Promotor hindeutet. Da sowohl in der Literatur als auch in den Datenbanken kein Transkriptionsterminator zwischen den Genen *nirJ* und *nirN* beschrieben ist, wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die transkribierte mRNA die Gene *nirJEN* umfasst. Der neu entdeckte *nirJ*-Promotor sollte nun durch *nirJ'*-*lacZ*-Reporterergenfusionen auf seine Aktivität hin getestet werden.

3.2.3.2 Untersuchung der *nirJ*-Promotoraktivität

Die Aktivität eines Promotors kann mittels Promotor-*lacZ*-Reporterergenfusionen analysiert werden. Um die Aktivität des *nirJ*-Promotors (*nirJ'*) zu untersuchen, wurden *nirJ'*-*lacZ*-Reporterergenfusionen hergestellt (Kapitel 2.5.4-7). Zur Konstruktion des Plasmids pJW1 wurde ein 463 bp langes DNA-Amplifikat der *nirJ*-Promotorregion in den Vektor pJW0 (mini-CTX-*lacZ*, Gm^r) kloniert. Die Plasmide pJW0 und pJW1 wurden mittels Biparental-Mating (Kapitel 2.5.13) in den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 eingebracht und die *nirJ'*-*lacZ*-Reporterergenfusion ins Chromosom eingebaut. Die Kultivierung der so erzeugten *P. aeruginosa*-Stämme PAO1-pJW0 und PAO1-pJW1 erfolgte unter aeroben und anaeroben Bedingungen

unter Zugabe von 50 mM Natriumnitrat. Im Anschluss daran wurden β -Galactosidaseaktivitätstests durchgeführt (Kapitel 2.5.9), um die Expression des Gens *lacZ* zu quantifizieren. Abbildung 31 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

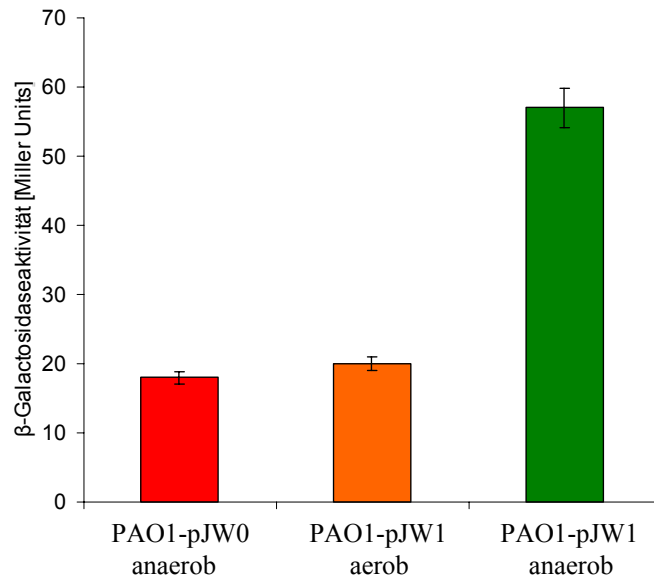


Abbildung 31: Quantitative Analyse der *lacZ*-Expression unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen durch Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben. Rot dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität der Negativkontrolle PAO1-pJW0 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Orange dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität im Stamm PAO1-pJW1 nach Kultivierung unter aeroben Bedingungen. Grün dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität des Stamms PAO1-pJW1 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen.

Aus Abbildung 31 geht hervor, dass die Expression des *lacZ*-Gens, das unter Kontrolle des *nirJ*-Promotors stand (PAO1-pJW1), unter anaeroben Kultivierungsbedingungen und Zugabe von 50 mM Natriumnitrat um den Faktor 3 im Vergleich zu aeroben Kultivierungsbedingungen erhöht war. Das *lacZ*-Expressionslevel des aeroben Experiments lag dabei auf dem Niveau der Negativkontrolle, bei der das *lacZ*-Gen nicht unter der Kontrolle des *nirJ*-Promotors stand (PAO1-pJW0). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der *nirJ*-Promotor in *P. aeruginosa* nur unter aneroben Nitratatmungsbedingungen aktiv ist und somit die Aktivierung der Expression der Gene *nirJEN* unter anaeroben Bedingungen stattfindet. Dieses Ergebnis passt gut in den globalen Kontext der Denitrifikation, da es sich dabei um eine Form der Energiegewinnung unter Sauerstoffmangelbedingungen handelt. Insgesamt war die anaerobe Induktion des *lacZ*-Expressionslevels relativ gering (Faktor 3), was auf einen schwachen Promotor

zur Feinregulierung der Transkription der Gene *nirJEN* hindeutet. Durch Verkürzung des *nirJ*-Promotorfragments sollte nun die Promotorregion mittels *lacZ*-Reporterfusionen weiter definiert werden.

3.2.3.3 Eingrenzung der *nirJ*-Promotorregion durch verkürzte *nirJ'*-*lacZ*-Reportergenkonstrukte

Um die *nirJ*-Promotorregion weiter zu charakterisieren, wurden *nirJ'*-*lacZ*-Reporterfusionen unterschiedlicher Länge hergestellt. Dazu wurde der 5'-Bereich des anfangs 463 bp umfassenden *nirJ*-Promotorfragments schrittweise verkürzt. Die so erhaltenen Plasmide pJW2 (363 bp), pJW3 (266 bp), pJW4 (166 bp) und pJW5 (66 bp) wurden mittels Biparental-Mating (Kapitel 2.5.13) in den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 eingebracht und die jeweiligen *nirJ'*-*lacZ*-Reporterfusionen ins *P. aeruginosa* Chromosom eingebaut. Die Kultivierung der *P. aeruginosa*-Stämme PAO1-pJW2 bis PAO1-pJW5 erfolgte unter anaeroben Bedingungen und Zugabe von 50 mM Natriumnitrat. Im Anschluss daran wurden β -Galactosidaseaktivitätstests durchgeführt (Kapitel 2.5.9), um die Expression des *lacZ*-Gens in den jeweiligen PAO1-Stämmen zu quantifizieren. Abbildung 32 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

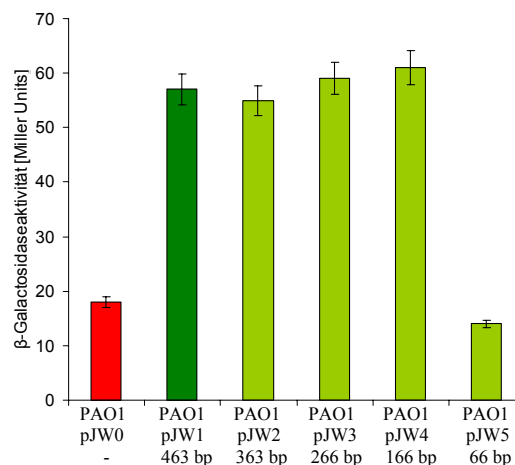


Abbildung 32: Quantitative Analyse der *lacZ*-Expression der *nirJ*-Promotorverkürzungen unter anaeroben Kultivierungsbedingungen durch Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben. Rot dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität der Negativkontrolle PAO1-pJW0 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Dunkelgrün dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität im Stamm PAO1-pJW1 nach Kultivierung unter aeroben Bedingungen. Hellgrün dargestellt sind die β -Galactosidaseaktivitäten der Stämme PAO1-pJW2-5 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen.

Betrachtet man Abbildung 32, so wird deutlich, dass die Promotorverkürzungen bis zu dem Fragment, welches 166 bp umfasste, keine Auswirkung auf das Expressionslevel des *lacZ*-Gens hatten. Für alle diese unterschiedlich langen *nirJ*'-*lacZ*-Reportergerkonstrukte wurde unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat eine Induktion der *lacZ*-Expression um den Faktor 3 beobachtet im Vergleich zur Negativkontrolle, in der das *lacZ*-Gen nicht unter Kontrolle des *nirJ*-Promotors stand. Das 166 bp lange Promotorfragment entspricht dem Bereich von -124 bp bis +42 bp relativ zum *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt. Eine weitere Verkürzung des *nirJ*-Promotorfragments auf 66 bp, was der Region von -24 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* in Relation zum *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt entspricht, führte zu einem Verlust der erhöhten β -Galactosidaseaktivität. Zusammenfassend konnte also bis hierher gezeigt werden, dass die Expression von Genen, die unter der Kontrolle des *nirJ*-Promotors stehen, unter anaeroben Nitratatmungsbedingungen induziert wird. Weiterhin wurde die *nirJ*-Promotorregion auf den Bereich von -124 bp bis +42 bp relativ zum *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt eingegrenzt. Im Folgenden sollte nun der Einfluss der Proteine NirDLGH auf die Aktivität des *nirJ*-Promotors untersucht werden.

3.2.3.4 Einfluss der Proteine NirDLGH auf die Aktivität des *nirJ*-Promotors

Um festzustellen, ob die Proteine NirDLGH für die Aktivität des neu entdeckten *nirJ*-Promotors eine Rolle spielen, wurde das Plasmid pJW4 (166 bp *nirJ*-Promotorfragment) in verschiedene *P. aeruginosa* PAO1-Mutanten, die eine Transposoninsertion in den *nirDLGH*-Genen tragen (vgl. Tabelle 4), mittels Biparental-Mating (Kapitel 2.5.13) eingebracht. Die Kultivierung der erzeugten *P. aeruginosa*-Stämme PAO1- Δ *nirD*-ID38093-pJW4, PAO1- Δ *nirD*-ID51332-pJW4, PAO1- Δ *nirL*-ID47325-pJW4, PAO1- Δ *nirG*-ID14212-pJW4 und PAO1- Δ *nirH*-ID52924-pJW4 erfolgte unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von 50 mM Natriumnitrat. Im Anschluss daran wurden β -Galactosidaseaktivitätstests durchgeführt (Kapitel 2.5.9), um die Expression des *lacZ*-Gens zu quantifizieren. Abbildung 33 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

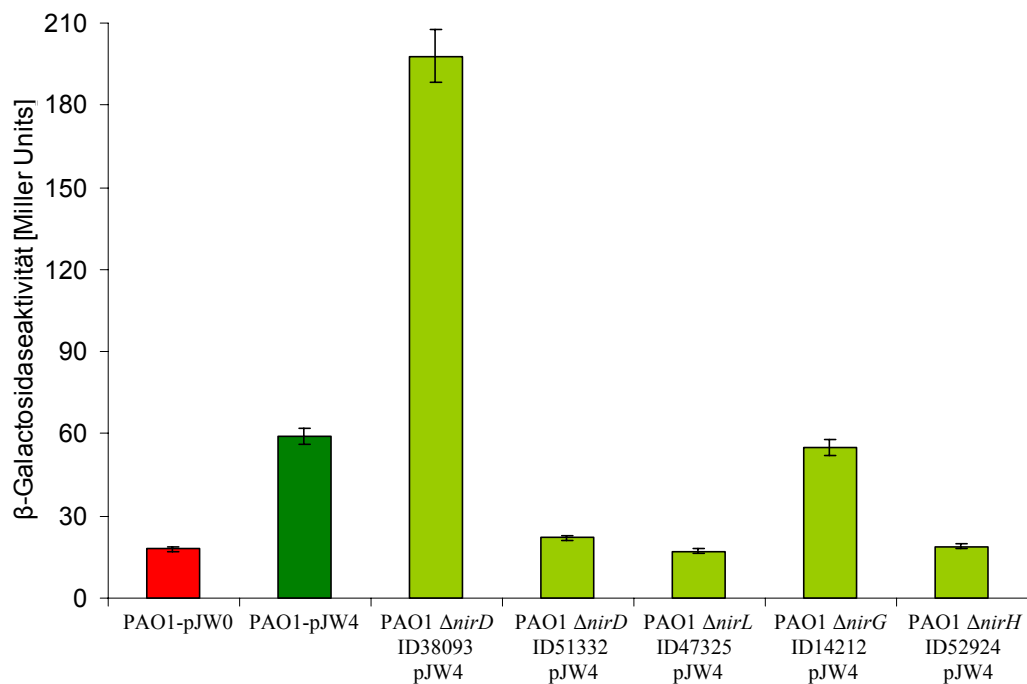


Abbildung 33: Quantitative Analyse der *lacZ*-Expression verschiedener PAO1-Mutanten, transformiert mit pJW0 bzw. pJW4, unter anaeroben Kultivierungsbedingungen durch Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben. Rot dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität der Negativkontrolle PAO1-pJW0 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Dunkelgrün dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität im Stamm PAO1-pJW1 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Hellgrün dargestellt sind die β -Galactosidaseaktivitäten der Stämme PAO1- $\Delta nirD$ -ID38093-pJW4, PAO1- $\Delta nirD$ -ID51332-pJW4, PAO1- $\Delta nirL$ -ID47325-pJW4, PAO1- $\Delta nirG$ -ID14212-pJW4 und PAO1- $\Delta nirH$ -ID52924-pJW4.

Bei Betrachtung von Abbildung 33 wird deutlich, dass die Transposoninsertion im *nirG*-Gen keinen Einfluss auf das Expressionslevel des *lacZ*-Gens im Vergleich zur PAO1-Wildtyp Kontrolle hatte. Im Gegensatz dazu war die Expression des *lacZ*-Gens in *P. aeruginosa* Mutanten, die die Transposoninsertion in den Genen *nirL* und *nirH* trugen verringert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Proteine NirL und NirH an der Regulation der *nirJ*-Promotoraktivität beteiligt sein könnten. Interessanterweise verhielten sich die beiden *nirD*-Transposonmutanten unterschiedlich. Die niedrige Expression des *lacZ*-Gens in der *nirD*-Transposonmutante ID51332 könnte durch evtl. auftretende *downstream*-Effekte erklärt werden. Diese würden eine Transkription der nachfolgenden Gene, z.B. *nirL* und *nirH*, verhindern, so dass der gleiche Phänotyp wie bei diesen Mutanten beobachtet wurde. Das stark erhöhte *lacZ*-Expressionslevel der *nirD*-Transposonmutante ID38093 könnte damit erklärt werden, dass das ursprünglich

insetierte Tn5-Transposon unter Umständen eine aktive *lacZ*-Fusion enthält (Jacobs *et al.*, 2003) und so den eigentlichen Phänotyp überdeckte.

Eine alternative Methode zur Bestimmung des Einflusses der Proteine NirDLGH auf die Aktivität des *nirJ*-Promotors besteht darin, die Expression des *lacZ*-Gens, welches unter Kontrolle des *nirJ*-Promotors steht, in *E. coli* zu bestimmen unter gleichzeitiger Produktion der rekombinanten NirDLGH Proteine. Hierzu wurde der *E. coli*-Stamm DH10B mit den Plasmiden pJM1-3 (Produktion von NirD, NirD/L, NirG/H) bzw. pET14b-nirL, pET14b-nirG, pET14b-nirH und dem Plasmid pJW4 (166 bp *nirJ*-Promotorfragment) kotransformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von 50 mM Natriumnitrat. Im Anschluss daran wurden β -Galactosidaseaktivitätstests durchgeführt (Kapitel 2.5.9), um die Expression des *lacZ*-Gens zu quantifizieren. Abbildung 34 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

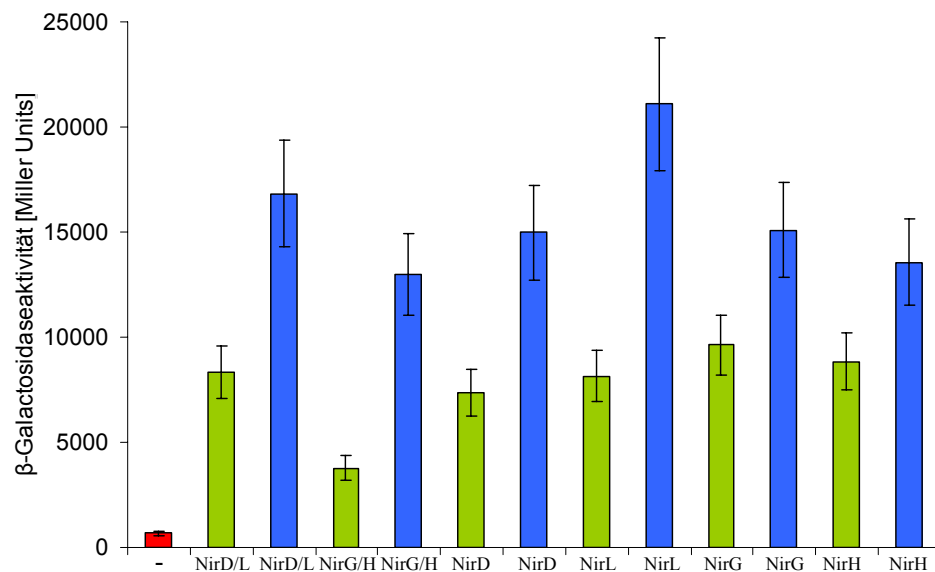


Abbildung 34: Quantitative Analyse der *lacZ*-Expression im heterologen *E. coli*-System unter aeroben und anaeroben Kultivierungsbedingungen durch Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben. Rot dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität der Negativkontrolle, welche ein pACYCDuet1-Plasmid enthält, nach der Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Hellgrün eingefärbt sind die β -Galactosidaseaktivitäten unter aeroben Bedingungen. Blau eingefärbt sind die erhaltenen β -Galactosidaseaktivitäten unter anaeroben Kultivierungsbedingungen. Die jeweils in *E. coli* DH10B produzierten rekombinanten Proteine sind aufgeführt.

Betrachtet man Abbildung 34, so war zunächst zu beobachten, dass die Expression des *lacZ*-Gens in Anwesenheit der Proteine NirDLGH generell stark induziert war im Vergleich zur Kontrolle, bei der keines der NirDLGH-Proteine anwesend war.

Weiterhin war das Expressionslevel des *lacZ*-Gens in allen Stämmen bei anaerober Kultivierung im Vergleich zur aeroben Kultivierung ca. um den Faktor zwei erhöht. Im Gegensatz zu den untersuchten Reporterfusionen im homologen *P. aeruginosa*-System war unter aeroben Kultivierungsbedingungen jedoch kein Abfall des Expressionslevels auf das Niveau der Negativkontrolle festzustellen. Insgesamt war bei Anwesenheit der NirDLGH-Proteine eine gesteigerte *lacZ*-Expression vorhanden, unabhängig davon, ob die Proteine einzeln oder in Kombination miteinander vorlagen. Daher konnten aus diesen Experimenten noch keine Schlüsse darüber gezogen werden, welche(s) der NirDLGH-Proteine für die Regulation der *nirJ*-Promotoraktivität verantwortlich sind (ist). Sowohl die *nirJ'*-*lacZ*-Reporterstudien in *P. aeruginosa*, als auch in *E. coli* zeigten jedoch, dass die NirDLGH-Proteine eine aktivierende Wirkung auf den *nirJ*-Promotor ausüben. Um genauer zu untersuchen, welche der NirDLGH-Proteine als Transkriptionsregulatoren fungieren und in der Lage sind an die DNA des *nirJ*-Promotorfragments zu binden, wurden DNA-Protein Interaktionsstudien mittels Gelretardationsanalysen durchgeführt.

3.2.3.5 DNA-Protein Bindungsstudien mittels Gelretardationsexperimenten

Die Fähigkeit der NirDLGH-Proteine an die DNA des *nirJ*-Promotorfragments zu binden, die Bedeutung der verschiedenen möglichen NirDLGH-Proteinkombinationen sowie die Lokalisierung der DNA-Bindestellen wurde mittels Gelretardationsanalysen untersucht. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass ein Protein-DNA-Komplex in einem nativen Acrylamidgel langsamer wandert als das entsprechende, freie DNA-Fragment (Kapitel 2.5.10). Da die *nirJ*-Promotorregion bereits initial charakterisiert wurde (vgl. Kapitel 3.2.3.1 und 3.2.3.2), wurde ein Fragment gewählt, welches die Region von -121 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes abdeckt. Als Negativkontrolle, bei der keine Protein-DNA Bindung auftreten sollte, diente ein Fragment, welches den Bereich von -21 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJ*-Gens darstellt. Abbildung 35 zeigt ein Gelretardationsexperiment, bei dem der Proteinkomplex NirD/L eingesetzt wurde.

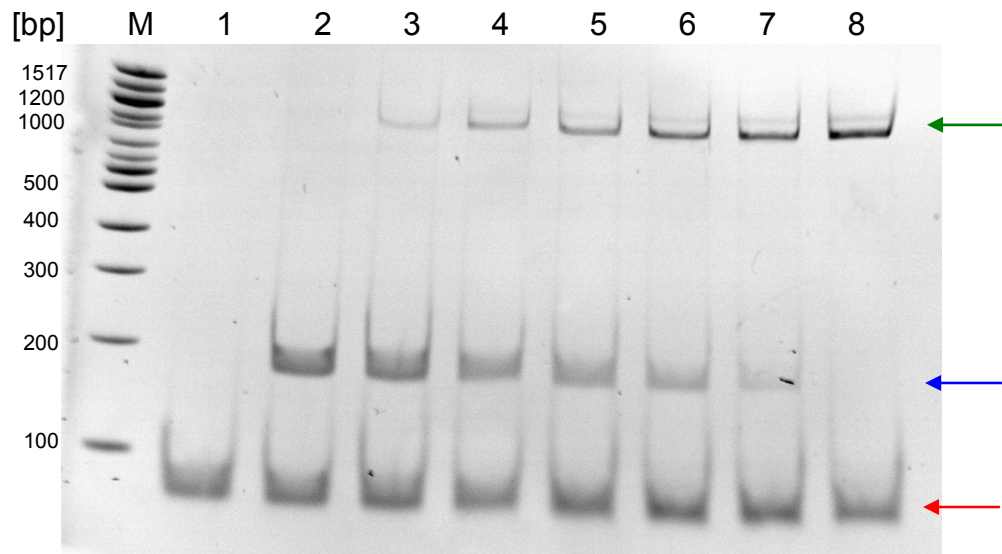


Abbildung 35: Gelretardationsexperiment zur Bestimmung des DNA-Bindeverhaltens des gereinigten Proteinkomplexes NirD/L aus *P. aeruginosa*. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.10 beschrieben. **Spur M:** 5 µl Quick Load 100 bp DNA ladder. Zur Orientierung wurden die Fragmentgrößen angegeben. **Spur 1:** 25 nM DNA-Fragment -21 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes. **Spur 2:** 25 nM je DNA-Fragment (-121/-21 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes). Es wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 3-8:** Die verwendete Proteinkonzentration an gereinigten NirD/L wurde von 32.5 auf 260 nM sukzessive gesteigert. Deutlich erkennbar ist die gleich bleibende Intensität des kleineren DNA-Fragments (roter Pfeil). Die Menge des größeren DNA-Fragments (blauer Pfeil) nimmt hingegen mit steigender Proteinkonzentration ab. Im gleichen Maße wird dabei eine weitere Bande, der DNA-Protein-Komplex, sichtbar (grüner Pfeil).

Betrachtet man Abbildung 35, so stellt man fest, dass das kleinere Fragment, die Negativkontrolle trotz Erhöhung der Proteinkonzentration über den gesamten Bereich nicht an Intensität verliert. Dies deutet darauf hin, dass der gereinigte Proteinkomplex NirD/L nicht an diesen Bereich bindet. Die Menge an „freier“ DNA des längeren Fragments, welches die Region von -121 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes abdeckt, nimmt hingegen mit zunehmender Proteinkonzentration ab. Im gleichen Maße, wie die Bande der „freien“ DNA an Intensität abnimmt, erscheint eine weitere Bande bei einer relativen Größe von 1200 bp. Hierbei handelt es sich um den Protein-DNA-Komplex. Interessanterweise wurde diese Beobachtung nur unter strikt anaeroben Bedingungen gemacht. Bei detaillierter Betrachtung fällt auch auf, dass auf Höhe des DNA-Proteinkomplexes zwei Banden zu erkennen sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine unterschiedliche Anzahl an NirD/L-Molekülen pro DNA-Fragment bindet. Ein vollständiger „band-shift“ trat erst bei Verwendung eines 10-fachen Überschusses an

Protein im Vergleich zur eingesetzten DNA-Menge auf. Diese Ergebnisse stützen den Befund aus Kapitel 3.2.3.2. Es konnte eine deutliche Bindung des Proteinkomplexes NirD/L an die neu entdeckte Promotorregion gezeigt werden.

Um zu untersuchen, inwieweit die Einzelproteine NirD, NirL, NirG und NirH bzw. der Proteinkomplex NirG/H eine DNA-Bindung aufweisen, wurden weitere Gelretardationsexperimente durchgeführt. Abbildung 36 stellt die Resultate dieser „band-shift“-Experimente dar.

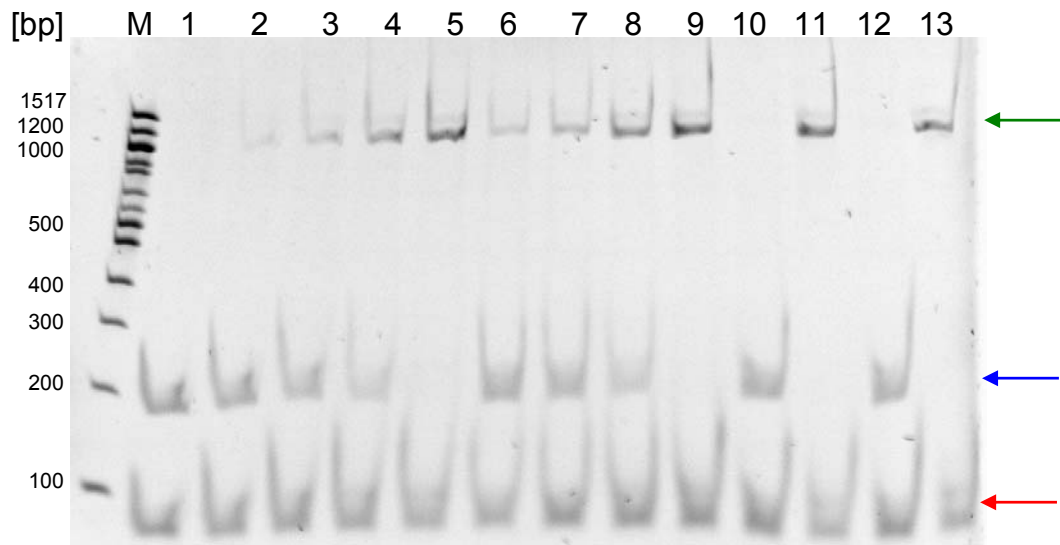


Abbildung 36: Gelretardationsexperiment zur Bestimmung des DNA-Bindeverhaltens der Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H bzw. der Einzelproteine NirD, NirL, NirG und NirH aus *P. aeruginosa*.

Die Durchführung der Experimente erfolgte nach Kapitel 2.5.10. **Spur M:** 5 µl Quick Load 100 bp DNA ladder. Zur Orientierung wurden die Fragmentgrößen angegeben. **Spur 1-13:** 25 nM je DNA-Fragment (-121/-21 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes). In Spur 1 wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 2-5:** Die verwendete Proteinkonzentration von gereinigtem NirD/L wurde von 65 auf 260 nM sukzessive gesteigert. **Spur 6-9:** Die verwendete Proteinkonzentration von gereinigtem NirG/H wurde von 65 auf 260 nM sukzessive gesteigert. **Spur 10:** Zugabe von 260 nM gereinigtem NirD. **Spur 11:** Zugabe von 260 nM gereinigtem NirL. **Spur 12:** Zugabe von 260 nM gereinigtem NirG. **Spur 13:** Zugabe von 260 nM gereinigtem NirH.

Deutlich erkennbar ist die gleich bleibende Intensität des kleineren DNA-Fragments (roter Pfeil). Die Menge der „freien“ DNA des größeren DNA-Fragments (blauer Pfeil) nimmt hingegen mit steigender Proteinkonzentration ab. Im gleichen Maße wird dabei eine weitere Bande, der DNA-Protein-Komplex, sichtbar (grüner Pfeil). Ein „band-shift“ wird bei den Einzelproteinen NirL und NirH, sowie bei den Proteinkomplexen NirD/L und NirG/H beobachtet.

Aus Abbildung 36 geht hervor, dass sowohl beide Proteinkomplexe (NirD/L und NirG/H) als auch die Einzelproteine NirL und NirH an das gewählte DNA-Fragment (-121 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes) binden können. Die DNA-Protein-Interaktion fand nur unter anaeroben Bedingungen

statt. Es wurde keine DNA-Bindung für die Proteine NirD und NirG aus *P. aeruginosa* beobachtet.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die eigentliche DNA-Bindung der Proteinkomplexe NirD/L bzw. NirG/H durch die Proteine NirL bzw. NirH erfolgt. Ob eine Dissoziation der Proteinkomplexe im Zuge der Protein-DNA-Interaktion erfolgt und letztlich die Einzelproteine NirL bzw. NirH an die DNA binden, kann durch die Gelretardationsexperimente nicht bestimmt werden. Dies wäre jedoch durchaus denkbar, da den Proteinen NirDLGH von Prof. Dr. M. J. Warren eine enzymatische Funktion zugeordnet wird (vgl. Kapitel 1.3.4.4) und so, je nach Oligomerisierungsstatus (Heterodimer vs. Homodimer), unterschiedliche Proteinfunktionen vorstellbar wären.

Dieser Hypothese widerspricht jedoch die Tatsache, dass in manchen denitrifizierenden Bakterien, wie z.B. *D. shibae* oder *H. thermophilus*, Fusionsproteine NirDL vorliegen, so dass keine Dissoziation erfolgen kann. Eine finale Lösung dieser interessanten Fragestellung kann letztlich nur mittels einer biophysikalischen Strukturaufklärung bzw. Kokristallisation der Proteine NirDLGH mit Substrat oder DNA erfolgen.

Um die DNA-Binderegion der NirDLGH-Proteine weiter einzugrenzen, wurden weitere DNA-Fragmente (oJW4 und 5 sowie oJW7 und oJW9-11, vgl. Tabelle 6) in Gelretardationsanalysen eingesetzt. Abbildung 37A stellt die verwendeten Oligonukleotide schematisch dar, Abbildung 37B stellt die Resultate dieser „*band-shifts*“ dar.

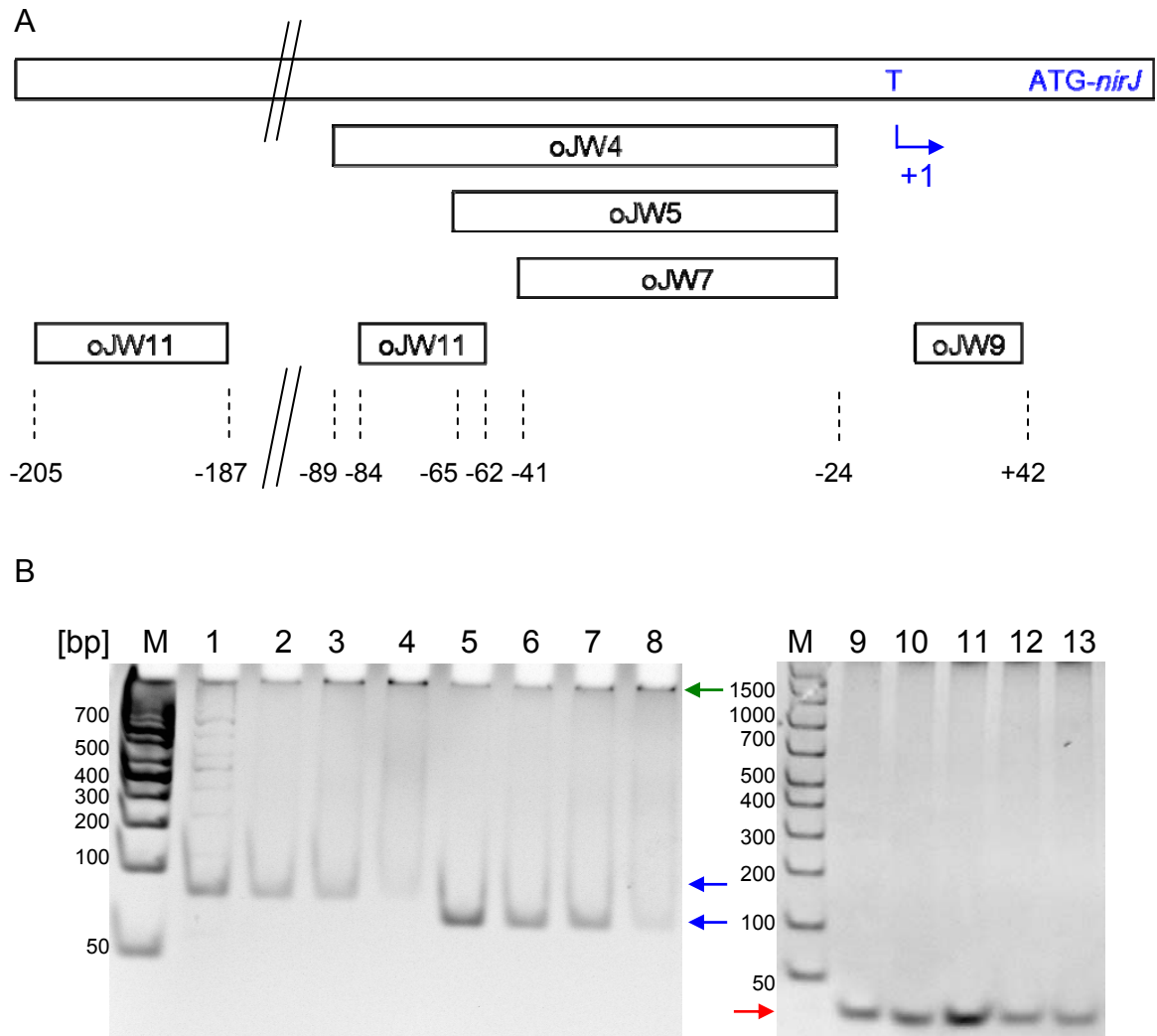


Abbildung 37: A) Schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotide. B) Gelretardationsexperiment zur Bestimmung des DNA-Bindeverhaltens der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa*.

A) Schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotide. Die relativen Positionen zum *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt sind angegeben. Blau hervorgehoben ist der Start des Gens *nirJ* sowie der *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt T. B) Die Durchführung der Experimente erfolgte nach Kapitel 2.5.10. **Spur M:** 5 µl EZ AmpliSize Molecular Ruler. Zur Orientierung wurden die Fragmentgrößen angegeben. **Spur 1-4:** 25 nM oJW4 (-104 bis -24 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes). In Spur 1 wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 2-4:** Die verwendete Proteinkonzentration von NirDLGH wurde von 65 auf 260 nM sukzessive gesteigert. **Spur 5-8:** 25 nM oJW5 (-89 bis -24 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes). In Spur 5 wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 6-8:** Die verwendete Proteinkonzentration von NirDLGH wurde von 65 auf 260 nM sukzessive gesteigert. **Spur 9:** 25 nM oJW7 (-41 bis -21 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes). Es wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 10:** 25 nM oJW7 mit Zugabe von 260 nM NirDLGH. **Spur 11:** 25 nM oJW9 (+21 bis +42 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes) mit Zugabe von 260 nM NirDLGH. **Spur 12:** 25 nM oJW10 (-205 bis -187 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes) mit Zugabe von 260 nM NirDLGH. **Spur 13:** 25 nM oJW11 (-84 bis -59 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes) mit Zugabe von 260 nM NirDLGH.

Aus den Gelretardationsexperimenten mit den Oligonukleotiden oJW4 und oJW5 (Abbildung 37B) geht hervor, dass die Proteine NirDLGH an eine DNA-Region binden, die zwischen -89 bp und -24 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes liegt. Durch Zugabe der Proteine NirDLGH zu den entsprechenden DNA-Fragmenten war eine Abnahme des „freien“ Oligonukleotides (blauer Pfeil in Abbildung 37B) zu beobachten. Ein größeres Fragment, welches dem DNA-Protein-Komplex entspricht, wurde beobachtet, blieb jedoch in den Taschen des Acrylamidgels zurück (grüner Pfeil in Abbildung 37B). Aus diesem Grund wurden weiterführende Experimente mit kommerziell erworbenen Gelen (vgl. Tabelle 3) durchgeführt.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl in den Bereichen von -205 bp bis -187 bp, -84 bp bis -59 bp sowie -41 bp bis -21 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes, als auch im Bereich von +24 bp bis +42 bp *downstream* keine DNA-Protein-Interaktion stattfindet (Gelretardationsexperimente mit den Oligonukleotiden oJW7, oJW9, oJW10 und oJW11, Abbildung 37B, roter Pfeil). In diesen Experimenten blieb die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes aus.

Um die DNA-Binderegion von NirDLGH noch genauer einzugrenzen wurden weitere Gelretardationsexperimente mit den Oligonukleotiden oJW6 und oJW8 durchgeführt (Abbildung 38).

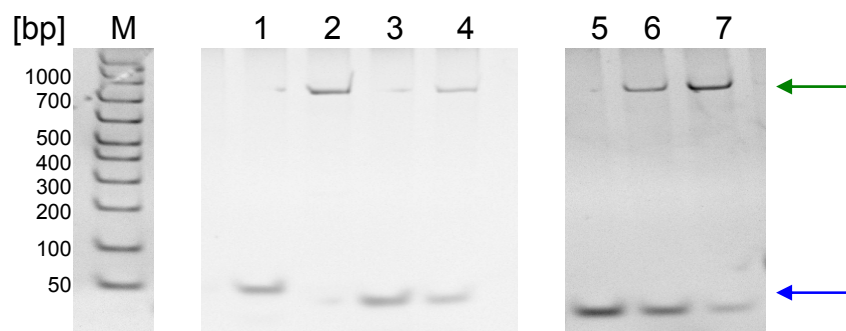


Abbildung 38: Gelretardationsexperiment zur detaillierten Bestimmung der DNA-Binderegion der Proteinkomplexe NirD/L bzw. NirG/H aus *P. aeruginosa*. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach Kapitel 2.5.10. **Spur M:** 5 µl EZ AmpliSize Molecular Ruler. Zur Orientierung wurden die Fragmentgrößen angegeben. **Spur 1:** 25 nM DNA-Fragment oJW6. Es wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 2:** 25 nM oJW6 mit Zugabe von 260 nM NirD/L. **Spur 3 und 5:** 25 nM DNA-Fragment oJW8. Es wurde kein Protein hinzugegeben. **Spur 4:** 25 nM oJW 8 mit Zugabe von 520 nM NirD/L. **Spur 6/7:** 25 nM oJW8, die verwendete Proteinkonzentration von NirG/H wurde von 260 nM (Spur 6) auf 520 nM (Spur 7) erhöht. Die Menge des „freien“ DNA-Fragments (blauer Pfeil) nimmt mit steigender Proteinkonzentration ab. Das DNA-Fragment oJW6 bildet bereits bei 260 nM zu 100% einen DNA-Protein-Komplex (grüner Pfeil). Das DNA-Fragment oJW8 bildet selbst bei 520 nM Protein keinen vollständigen DNA-Protein-Komplex aus.

Betrachtet man Abbildung 38, so stellt man fest, dass das Fragment oJW6 (-62 bis -24 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes) bei einer eingesetzten Proteinmenge von 260 nM komplett in den DNA-Protein-Komplex überführt wurde. Diese Beobachtung wurde bei dem DNA-Fragment oJW8 (-56 bis -24 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes) nicht vollständig festgestellt. Bei einer weiteren Verkürzung des DNA-Fragments zu oJW7 (-41 bis -21 bp *upstream* des *nirJEN* Transkriptionsstartpunktes, vgl. Abbildung 37) fand keine Interaktion mehr zwischen eingesetzter DNA und Protein statt. Dies deutet darauf hin, dass das entscheidende DNA-Sequenzmotiv, welches für die Bindung der NirDLGH-Proteine benötigt wird, zwischen -62 und -41 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes liegt. Die Ausbildung der Protein-DNA-Interaktion war in allen Gelretardationsexperimenten nur unter anaeroben Bedingungen zu beobachten. Ein Unterschied im DNA-Bindungsverhalten der Proteinkomplexe NirD/L bzw. NirG/H konnte nicht festgestellt werden.

Die oben beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 39 vereinfacht schematisch zusammengefasst.

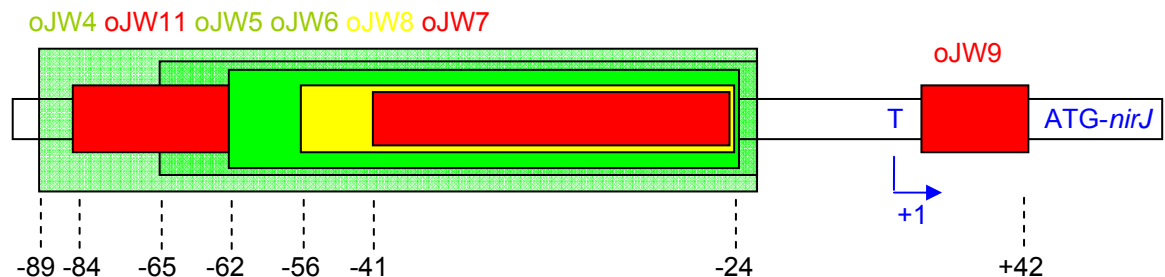


Abbildung 39: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Gelretardationsexperimente.

Rot markiert sind Oligonukleotide, bei denen keine Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes beobachtet wurde. Eine grüne Markierung symbolisiert das Auftreten eines DNA-Protein-Komplexes. Gelb dargestellt ist eine schwächere DNA-Protein-Interaktion. Blau hervorgehoben ist der Start des Gens *nirJ* sowie der *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt T.

Durch die Gelretardationsexperimente wurde die Binderegion der Proteine NirDLGH innerhalb des *nirJ*-Promotorbereichs weiter eingengt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass sie *upstream* der -35 Region des *nirJEN*-Promotors liegt.

Anschließend sollte nun eine basengenaue Beschreibung der Nukleotidsequenz des Bereichs der DNA-Protein-Wechselwirkung mit Hilfe von DNaseI-Protektionsanalysen erfolgen.

3.2.3.6 Bestimmung der Transkriptionsfaktorbindestelle mittels DNaseI-Protektionsanalysen

Um die DNA-Bindestelle der Proteine NirDLGH in der oben eingegrenzten Promotorregion zu lokalisieren, wurden initiale DNaseI-Protektionsanalysen durchgeführt. Hierfür wurde der rekombinante, gereinigte Proteinkomplex NirD/L aus *P. aeruginosa* eingesetzt (Kapitel 3.2.1.2). Für dieses Experiment wurden 2,5 nM eines 266 bp langen DIG-markierten Fragments (kodierender Strang) eingesetzt, welches den Bereich von -221 *upstream* bis +42 *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartes abdeckt. Zu den Ansätzen wurden 0, 50 bzw. 100 nM Protein zugegeben. Nach DNaseI-Verdau, Trennung der entstandenen DNA-Fragmente, Kontaktblot und Detektion (vgl. Kapitel 2.5.11) ergab sich Abbildung 40.

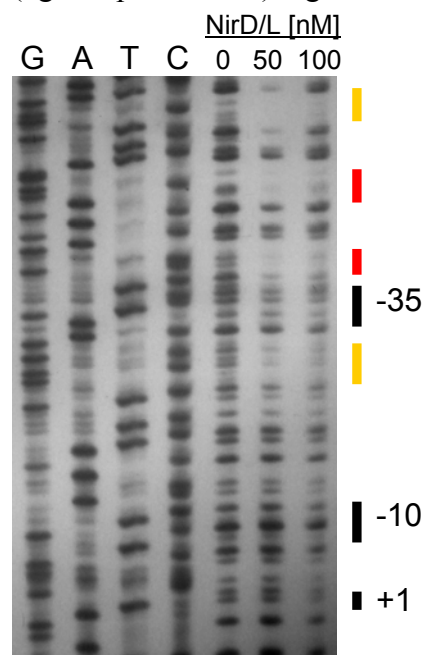


Abbildung 40: Lokalisierung der NirD/L Bindestelle mittels DNaseI-Protektionsanalysen. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.5.11 beschrieben. Das verwendete DIG-markierte DNA-Fragment entspricht der Region -221 bp *upstream* bis +42 bp *downstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes, wovon hier nur der relevante Teil gezeigt ist. Die potentiellen Binderegionen des Proteinkomplexes NirD/L sind rot markiert, eventuelle Binderegionen gelb. Die +1, -10 und -35 Regionen sind angegeben (schwarze Balken). Die Sequenzierreaktion des kodierenden Strangs, durchgeführt mit dem Oligonukleotid oJW2, ist mit den Basen-Abkürzungen G, A, T und C markiert.

Betrachtet man Abbildung 40, so stellt man fest, dass in manchen Bereichen keine Signale detektiert werden können (rote Markierungen). Diese Bereiche deuten auf eine Bindung des eingesetzten Proteins, in diesem Fall NirD/L, hin, da die Bindung die Degradation der DNA durch die DNaseI verhindert. Diese für Transkriptionsfaktoren typische Beobachtung wird als „Footprint“ bezeichnet. Durch die parallel aufgetragenen Sequenzierreaktion kann die geschützte Region einer spezifischen Basenabfolge zugeordnet werden. Hiermit war es möglich, die Binderegionen von NirD/L den DNA-Bereichen von -40 bis -45 bp und -52 bis -57 bp sowie eventuell -26 bis -32 bp und -64 bis -68 bp *upstream* des *nirJEN*-Transkriptionsstartpunktes zuzuordnen. Eine Detektion von geschützten DNA-Bereichen auf dem nicht-kodierenden Strang war leider erfolglos. Auffällig ist, dass die „Footprints“ im Bereich der -35-Region liegen. Dies unterstützt die zuvor erwähnte Hypothese, dass es sich bei dem *nirJ*-Promotor um einen schwachen Promotor handelt. Die Transkriptionsfaktoren NirDLGH könnten für eine leichtere Erkennung des -35-Bereichs des Promotors durch die RNA-Polymerase sorgen. Somit könnte es zur feinregulierten Transkription der Gene *nirJEN* kommen. Es wurde also gezeigt, dass eine DNA-Bindung der NirDLGH-Proteine im postulierten *nirJ*-Promotorbereich stattfindet. Damit kann Abbildung 30 um die potentiellen Binderegionen der hypothetischen Transkriptionsfaktoren NirDLGH erweitert werden (Abbildung 41).

```

CGAAGGCTATC GCCAG CAGATC CGCC
T GCTGC TCGGCG AGGACTGT CGCGCC
GACGAGATGCTGGT GAGCAGCCGCAT
CCTGAAGAAGACCGGCCTGCGCCTGG
CGCAGAAGGAGGAACGTCCATG-nirJ
      RBS          Start nirJ
-nirE-nirN-Terminator
  
```

Abbildung 41: Erweiterte schematische Darstellung der hypothetischen Promotorregion der Gene *nirJEN*.

Die dargestellte DNA-Sequenz zeigt 130 bp upstream des *nirJ*-Gens aus *P. aeruginosa*. Der durch die Primer-Extension-Analyse bestimmte Transkriptionsstart, die -10 und die -35 Region sind rot markiert. Blau hervorgehoben ist das Start-ATG des Gens *nirJ*, grün unterstrichen die Ribosomenbindestelle (RBS). Die vermuteten DNA-Bindestellen von NirDLGH sind gelb eingefärbt.

Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass drei der vier DNA-Binderegionen das Sequenzmotiv TCG enthalten bzw. dieses benachbart vorliegt. Dies könnte ein erster Hinweis auf die exakte Basenabfolge der Erkennungsregion der hypothetischen Transkriptionsfaktoren NirDLGH sein.

3.2.3.7 Beteiligung des *Integration Host Factors* (IHF) an der Regulation der Gene *nirJEN*

Durch bioinformatische Studien wurde mittels des Programms „*Virtual Footprint*“ (Münch *et al.*, 2005) eine potentielle IHF-Binderegion (vgl. Kapitel 1.4) ca. -120 bp *upstream* des Transkriptionsstartpunkts der Gene *nirJEN* gefunden. Ob die Expression der Gene *nirJEN* tatsächlich IHF-koreguliert ist, wurde mittels β -Galactosidastudien mit Hilfe des *P. aeruginosa*-Stamms PAO1 Δ IHF analysiert. Dafür wurde das initial verwendete *nirJ'*-*lacZ*-Reportergenkonstrukt pJW1, welches die potentielle IHF-Binderegion beinhaltet, in den *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 Δ IHF eingebracht. Abbildung 42 zeigt das erhaltene Ergebnis.

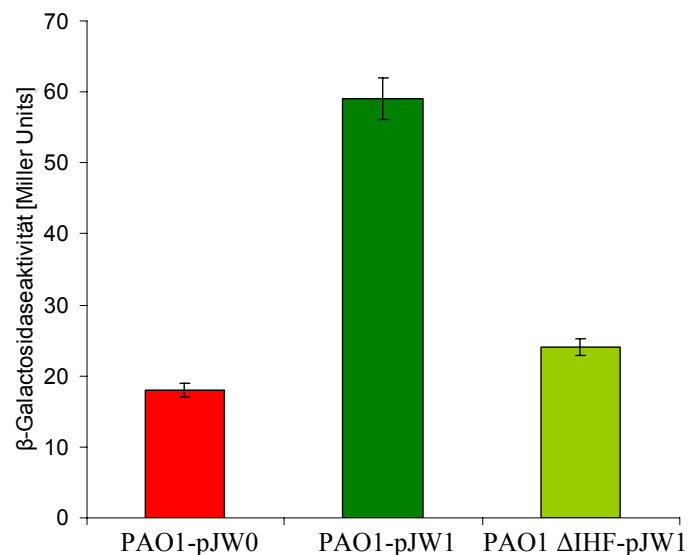


Abbildung 42: Quantitative Analyse der *lacZ*-Expression der *nirJ'*-*lacZ*-Reportergenfusionen unter anaeroben Kultivierungsbedingungen im Hinblick auf eine eventuelle Koregulation durch IHF.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben. Rot dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität der Negativkontrolle PAO1-pJW0 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Dunkelgrün dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität im Stamm PAO1-pJW1 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Hellgrün dargestellt ist die β -Galactosidaseaktivität im Stamm PAO1 Δ IHF-pJW1 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen.

In Abbildung 42 ist deutlich zu erkennen, dass die β -Galactosidaseaktivität und damit die *nirJ*-Promotoraktivierung in der PAO1 Δ IHF-Mutante auf den Wert der Negativkontrolle abfielen. Hieraus könnte man folgern, dass die Expression der Gene *nirJEN* IHF-abhängig ist. Allerdings wurden ebenfalls IHF-Binderegionen in der *nirS*-Promotorregion festgestellt. Sofern es in einer IHF-Deletionsmutante zu keiner Aktivierung der Expression des *nir*-Operons kommt (da der *nirS*-Promotor vermutlich IHF abhängig ist), werden auch die postulierten Transkriptionsaktivatoren NirDLGH nicht gebildet. Auch dies könnte ein Grund für die niedrige β -Galactosidaseaktivität im Stamm PAO1- Δ IHF sein. Untersuchungen mit einer *nirS'*-*lacZ*-Reporterengenfusion konnten leider nicht erfolgreich durchgeführt werden, um diese Hypothese zu untermauern. Des Weiteren sind pleiotrope Auswirkungen der IHF-Deletion denkbar, die die β -Galactosidaseaktivität des untersuchten Promotors beeinflussen.

Eine alternative Methode zur Untersuchung des Einflusses von IHF auf die Aktivierung des *nirJ*-Promotors bestand darin, die Expression des *lacZ*-Gens mittels mutierter *nirJ'*-*lacZ*-Reporterkonstrukte zu bestimmen. Hierfür wurde zunächst das heterologe *E. coli*-System (siehe oben) benutzt, bei welchem rekombinantes NirDLGH in basalen Mengen produziert wurde und die *nirJ'*-*lacZ*-Reporterengenfusionen plasmidkodiert vorlagen. Die für die *nirJ'*-*lacZ*-Reporterengenkonstrukte verwendeten DNA-Fragmente trugen verschiedene Basenaustausche in der IHF-Erkennungssequenz und/oder den mittels DNaseI-Protektionsanalysen identifizierten potentiellen NirDLGH Bindesequenzen (Abbildung 43A). Das Plasmid pJW6 enthielt eine Mutation (TCNNNGA zu GTNNNAC) in der in Abbildung 36 postulierten NirDLGH-Bindestelle und die postulierte IHF-Region war vollständig deletiert. Das Plasmid pJW7 enthielt neben der modifizierten Bindestelle die postulierte IHF-Bindesequenz. Das Plasmid pJW8 enthielt zusätzlich eine Mutation im IHF-Sequenzmotiv (CAACCTGTT zu ACCAAGTGT). Das Plasmid pJW9 enthielt die unmodifizierte Binderegion und die natürlich vorkommende IHF-Bindesequenz. Das Plasmid pJW10 stellt eine Promotordeletion zwischen derjenigen der Plasmide pJW4 und pJW5 dar. Das Plasmid pJW11 enthält die unmodifizierte Bindestelle sowie ein mutiertes IHF-Sequenzmotiv. Abbildung 43B zeigt die erhaltenen β -Galactosidaseaktivitäten für diese *nirJ'*-*lacZ*-Reporterengenfusionen gemessen in *E. coli*.

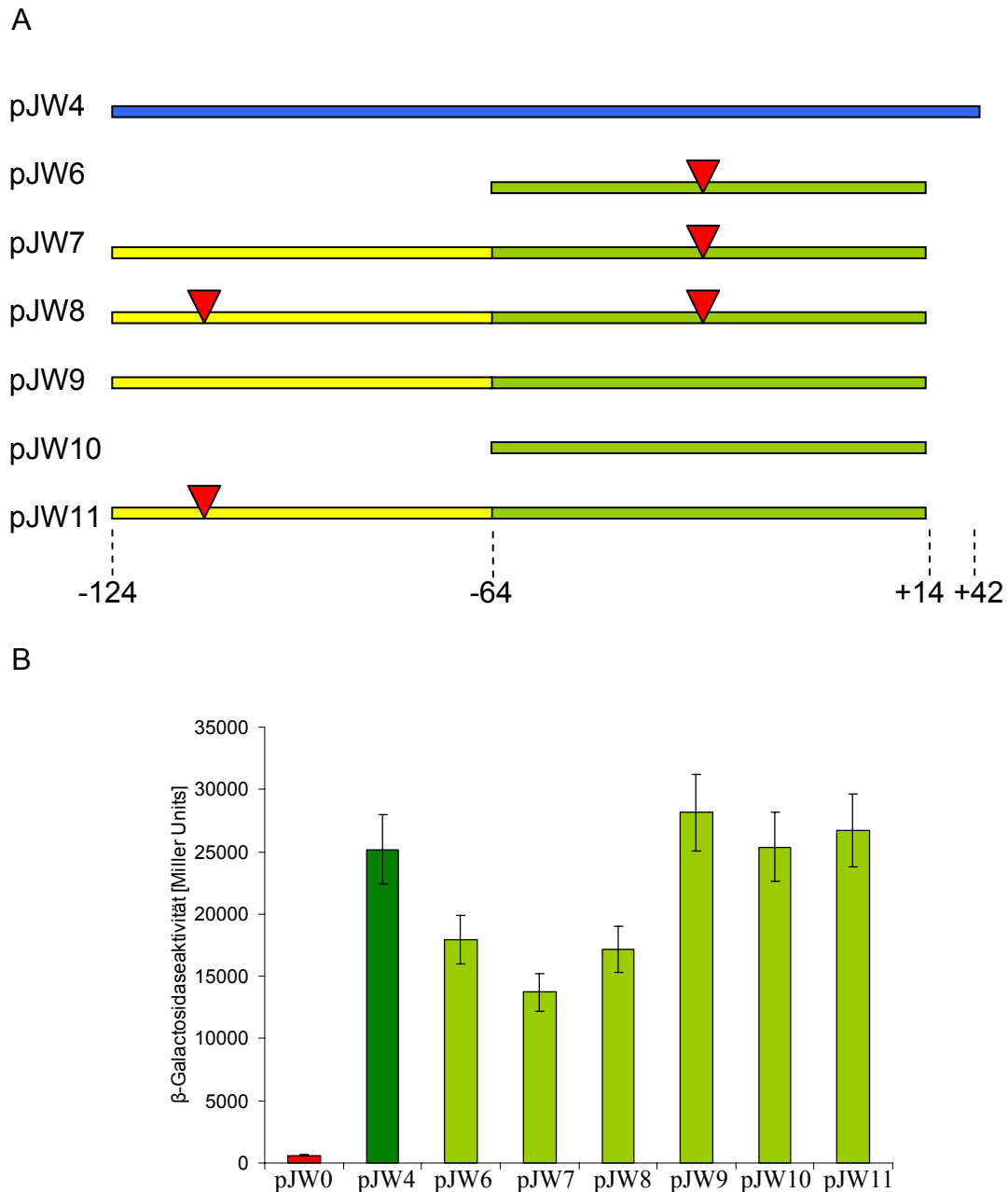


Abbildung 43: A) Schematische Darstellung der *nirJ*-Promotorfragmente der verwendeten Plasmide pJW4 und pJW6-pJW11. B) Quantitative Analyse der *lacZ*-Expression der *nirJ'*-*lacZ*-Reportergenfusionen unter anaeroben Kultivierungsbedingungen.

A) Blau dargestellt ist die in dem Plasmid pJW4 enthaltene *nirJ*-Promotrregion (-124 bp bis +42 bp respektive zum *nirJEN*-Transkriptionsstartpunkt). Grün dargestellt ist der Bereich, der die Binderegion (ca. 15 bp) der Proteine NirDLGH enthält. Gelb dargestellt ist der Bereich, der die postulierte IHF-Binderegion (ca. 10 bp) enthält. Rote Dreiecke markieren eingefügte Mutationen. B) Die Durchführung der Experimente erfolgte anaerob unter Zugabe von 50 mM Natriumnitrat wie in Kapitel 2.5.9 beschrieben. Rot dargestellt ist die β-Galactosidaseaktivität der Negativkontrolle *E. coli* DH10B-pJW0 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Dunkelgrün dargestellt ist die β-Galactosidaseaktivität im Stamm *E. coli* DH10B-pJW4 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen. Hellgrün dargestellt sind die β-Galactosidaseaktivitäten der Stämme *E. coli* DH10B-pJW6 bis 11 nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen.

Analysiert man Abbildung 43, so stellt man fest, dass alle *E. coli*-Stämme, die Plasmide enthalten, welche eine Mutation in der postulierten NirDLGH-Bindregion tragen, ein um ca. 40 % niedrigeres *lacZ*-Expressionslevel zeigen. Mutationen in der IHF-Bindesequenz oder deren Fehlen führen zu keiner signifikanten Veränderung der β -Galactosidaseaktivität. Dies steht nicht zwangsläufig im Kontrast zu dem in Abbildung 39 dargestellten Ergebnis, da dieses Experiment im heterologen *E. coli*-System durchgeführt wurde. Dennoch konnte der Hinweis auf eine IHF-Beteiligung nicht untermauert werden. Bei der eingeführten Mutation in der postulierten NirDLGH-Bindesequenz handelt es sich um einen drastischen Basenaustausch von TCNNNGA zu GTNNNAC in der Region bei ca. -46 bp *upstream* von *nirJ* respektive zum Transkriptionstartpunkt.

Betrachtet man die in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Ergebnisse zusammenfassend, so konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den Proteinen NirDLGH um aktivierende Transkriptionsregulatoren handelt. Ebenso konnte eine Beteiligung des IHF am Regulationsprozess postuliert werden. Die Regulation erfolgt dabei sauerstoffabhängig. Dies steht im Kontext mit der für die anaerobe Energiegewinnung nötige Denitrifikation, bei der dem *nir*-Operon eine entscheidende Funktion, nämlich die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid, zukommt.

3.2.4 Proteinkristallisation zur Strukturaufklärung der Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H

Eine detaillierte Analyse des Zusammenspiels der Proteine NirDLGH auf molekularer Ebene kann nur mittels Strukturaufklärung erfolgen. Daher wurde versucht, die Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H aus *P. aeruginosa* zu kristallisieren. Für den NirD/L-Komplex aus *P. aeruginosa* (vgl. Kapitel 2.6.1.1) wurden keine Bedingungen gefunden, die zu einer Kristallisation führten. Für den Proteinkomplex NirG/H konnten mehrere Bedingungen mit Kristallisationswachstum ermittelt werden. Die Optimierung der Kristalle war jedoch erfolglos und diese somit für eine Strukturaufklärung nicht geeignet. Im Gegensatz zu dem Komplex NirD/L aus *P. aeruginosa* konnten für das natürliche Fusionsprotein NirDL aus *H. thermophilus* (vgl. Kapitel 2.6.1.5) erste Kristalle erhalten werden. Nach erfolgreicher Reproduzierung und Optimierung wurde ein vollständiger Datensatz in Berlin am BESSY 14.1 (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für

Synchrotronstrahlung, Berlin, Deutschland) aufgenommen. Die Auflösungsgrenze der Daten lag bei ca. 3,2 Å. Abbildung 44 zeigt die erhaltenen Kristalle sowie das Röntgen-Streubild des Kristalls, von dem der Datensatz aufgenommen wurde. Des Weiteren sind die optimierten Kristallisationsbedingungen erläutert.

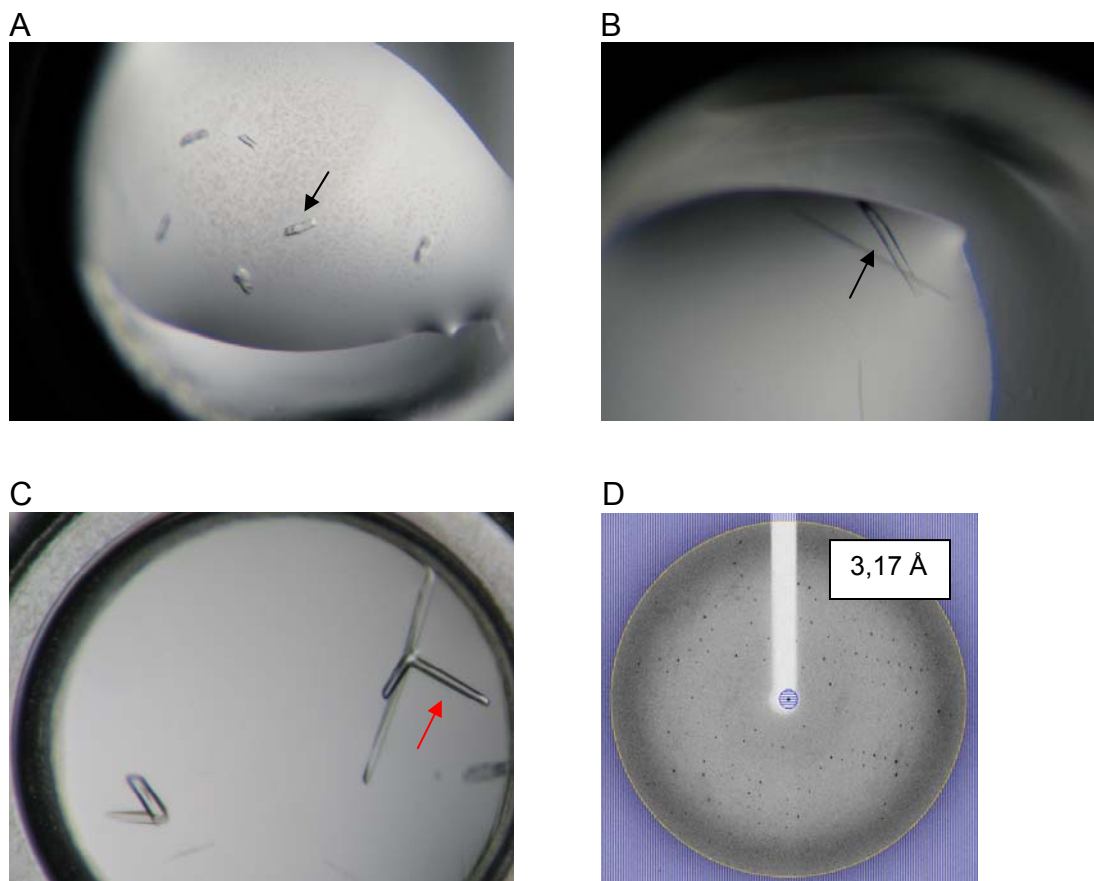


Abbildung 44: Kristalle und das Röntgen-Streubild von NirDL aus *H. thermophilus*.
Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.10 beschrieben. Ausgewählte Proteinkristalle wurden mit schwarzen Pfeilen markiert. Der Kristall der Datenaufnahme wurde mit einem roten Pfeil hervorgehoben. A) Proteinkristalle gewachsen in 0,2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 und 30 % (w/v) PEG 2000 MME. B) Proteinkristall gewachsen in 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 und 30 % (w/v) PEG 4000. C) Proteinkristalle gewachsen in einem Verfeinerungsscreen unter folgenden Bedingungen: 164 mM Natriumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,1 und 23,8 % PEG 4000. D) Röntgen-Streubild des in C) markierten Kristalls.

Betrachtet man Abbildung 44, so stellt man fest, dass alle Kristalle eine längliche Form aufweisen.

Tabelle 9 stellt die wichtigsten Kennzahlen des aufgenommenen Datensatzes zusammen.

Tabelle 9: Statistik des aufgenommenen Datensatzes von NirDL aus *H. thermophilus*

Kennzahl	Wert	Kennzahl	Wert
Auflösung	9,3 - 3,17 Å	Vollständigkeit	98,3 % (96,6 %)
Höchste Auflösung	3,36 – 3,17 Å	R _{merge}	8,0 (69,8)
Raumgruppe	C2	Redundanz	3,8 (34)
Zelldimensionen	a= 108,8 Å	I/σ	13,3 I (2,0 I)
	b= 75,96 Å		
	c= 53,21 Å		
	α= γ = 90 °		
	β= 100,1 °		
Wassergehalt	51,31 %	V _m	2,53 (Å ³ /Da)
Benutzte Software	XDS		

*Werte in Klammer beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale

Derzeit wird die Struktur in Kooperation mit Dr. Stefan Schmelz von der Abteilung für Molekulare Strukturbioogie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig gelöst.

3.2.5 Modell zur Funktionalität von NirDLGH aus *P. aeruginosa*

Aus den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen kann ein Modell zur Funktionalität der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* abgeleitet werden. Wie bereits diskutiert, liegen die Einzelproteine NirD, NirL, NirG und NirH als Homodimere, die Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H als Heterodimere vor (vgl. Kapitel 3.2.1). Eine Lrp-typische oktamere oder tetramere Form konnte nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die identifizierte *nirJEN*-Promotorregion in *P. aeruginosa* über ein IHF-Sequenzmotiv verfügt (vgl. Kapitel 3.2.3). Obwohl eine Rolle des Proteins IHF nicht eindeutig gezeigt werden konnte, ist dessen Beteiligung an der Regulation der Gene *nirJEN* aufgrund des Sequenzmotivs und der globalen „DNA-Architekturfunktion“ (vgl. Kapitel 1.4 und 3.2.3.7) sehr wahrscheinlich. Die Regulation der Transkription der Gene *nirJEN* durch NirDLGH ist dabei sauerstoffabhängig (vgl. Kapitel 3.2.3). Sauerstoffabhängigkeit bei Transkriptionsregulatoren kann durch Metallionen (z.B. in Form von Eisen-Schwefel-Clustern oder als Zentralatom eines Tetrapyrrols) oder Cysteinreste, welche auf oxidative Bedingungen reagieren, bedingt sein. Cysteinreste

können durch Oxidation Disulfidbrücken bilden, welche zu einer Konformationsänderung im Protein führen kann. Bioinformatische Aminosäuresequenzanalysen ergaben ein konserviertes Cystein im C-terminalen Bereich der Proteine NirL und NirH an Position 102 bzw. 103. Abbildung 45 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt eines Aminosäuresequenzalignments von homologen NirL-Proteinen bzw. NirDL-Fusionsproteinen aus verschiedenen Bakterien.

NirL-PSEAE	LDVADAEVDAVGRALAHETIVSLCYRRPRRLPMWPYNLFCMIHGRERGEVERQIEALLE
NirL-PSEST	MDIPDEQVDEVGRRLGQAAGVNLQYRPRRLPQWPYNLFCMVHGREREQVCQLIEQLLA
NirL-RALEU	WDVDDACIDALGEQVGALPFVSHCYRRPRNLPLWPYNLFAMAHARTREEALPLVARIAQ
NirL-THIDE	WDVADERIDELGERIGQLDFVTHCYRRPRHLPDWPYNLFCMVHGRERTREEVEAKAALIAD
NirL-HAHCH	WRVAEEEVNRLGAEISRTGLVSLCYQRKPHGPEWPYNLYCMLHGKSREEVLRRLQRLKA
NirDL-DINSH	WQVPPAQVAQAGPALAAVPGVTTCYQRKAVPGVWPYTYLNMIGHRSREDAMAVLKRARA
NirDL-PARDE	WRLPEAAVEAAGTALAGVPGVTTCYQRRCPGLWDWPLFCMIHARSHAEAMEVLAEARA
NirDL-ROSDE	FNVPPDEVEACGLALTAVQGVTTLCYERRAVPGVWPYTYLCMIHGRSRAETLDVLSQARV
	: : * : * : ** * * : * : * : :

Abbildung 45: Aminosäuresequenzalignment homologer NirL-Proteine bzw. NirDL-Fusionsproteine.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereichs der homologen Proteine. Das konservierte Cystein ist grau hinterlegt. Stern: Sequenzidentität. Doppelpunkt: Starke Sequenzhomologie. Punkt: Schwächere Sequenzhomologie. PSEAE: *P. aeruginosa*, PSEST: *P. stutzeri*, RALEU: *Ralstonia eutropha*, THIDE: *Thiobacillus denitrificans*, HAHCH: *Hahella chejuensis*, DINSH: *D. shibae*, PARDE: *P. denitrificans*, ROSDE: *Roseobacter denitrificans*.

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, handelt es sich bei dem C-terminalen Bereich von Lrp-Transkriptionsregulatoren in der Regel um die Effektorbindedomäne. Da in der vorliegenden Arbeit alle Ergebnisse auf Sauerstoff als Effektormolekül hindeuten, ist es durchaus denkbar, dass die Cysteine der Transkriptionsfaktoren NirDLGH in ihrer aktiven, DNA-bindenden Form reduziert vorliegen und das unter eintretenden oxidierenden Bedingungen die Ausbildung einer Disulfidbrücke erfolgt. Dadurch könnte eine Konformationsänderung im Protein erfolgen, wodurch die DNA-Bindung aufgehoben wird. Eine Kristallisation der DNA-bindenden Proteine NirL bzw. NirH unter aeroben und anaeroben Bedingungen könnte dies bestätigen.

Abbildung 46 zeigt die Homologie der Sekundärstrukturelemente der Proteine NirD, NirL, NirG und NirH aus *P. aeruginosa* zu Lrp und AsnC aus *E. coli* auf.

```

NirD      -----MDDLRRLLARYQKGLPICAEPYRRMAETLGCSEAEVLERLRRLLEADGA
NirL      ----MNPVEPLAAPQRQHLRYLLEQGLPLASRPYRVLAERIGAGEDEVLEQVRRWDEDGL
NirG      -----MDEFDRRLNRLQHGLPLEHPYALLAAELDCREEDILRRLLDLDLDDGT
NirH      ---MSACISPSDALLARRLIELTQAGLPLVADPWAWIAAQLRLSEAETLALLKRLRDAGV
AsnC      -----MENYLIDNLDRGILEALMG---NARTAYAEAKQFGVSPGTIHVRVEKMKQAGI
LRP       MVDSKKRPGKDLDRIDRNILNELQK---DGRISNVELSKRVGLSPPTCLERVRRLERQGF

NirD      LSRVGPVLRHQAG--ASTLAALAVPEER---LQVAERISQYAEVNNHNYQR-----EHR
NirL      FRRFGVILHHRALGYTANAMLVLDVADAE---VDAVGRALAHETIVSLCYRRPRRLPMWP
NirG      LTRFGPLEDIEPLGG-AFTLAAMSVPEAR---FEEIAALLAGWPQVAHNYRR-----EHA
NirH      IRRIAAVPNHYRLGYRHNGMTVWDVADER---IERLGRLVGGLSFVSHCYRRPRHLPPQR
AsnC      ITGARIDVSPKQLGYDVGCFIGIILKSAKD--YPSALAKLESLEDEVTEAYYT-----TGH
LRP       IQGYTALLNPHYLDASLLVFVEITLNRGAPDVFEQFNTAVQKLEETQECHLV-----SGD

NirD      YNLWFVLTAGDRAQLDRVLAEIAA-----DTGLQPLDLPMQEAYCIDLAFPLEASR---
NirL      YNLFCEMIHGRERGEVERQIEALLERHALRQTPHRWLFSLRAYKQCGGRYTAPPADLERRHG-
NirG      LNMWLVVACDSPAEVAETLARLER-----ESGLAVLDLPKEATYHVGLHFPL-----
NirH      YNLFAMVHGRSEAEIEGYRQOIRLLLGEDCRADEMLVSSRILKKTG---LRLAQKEERPC-
AsnC      YSIFIKVMCRSIDALQHVLINKIQ-----TIDEIQSTETLIVLQNEIMRTIKP-
LRP       FDYLLKTRVPDMSAYRKLLGETLLR-----LPGVNDTRTYVVMEEVKQSNRLVIKTR

```

Abbildung 46: Aminosäuresequenzalignment der Proteine NirL und NirH aus *P. aeruginosa* und Lrp und AsnC aus *E. coli*.

Dargestellt ist der C-terminale Bereich der homologen Proteine. Hellgrau hinterlegt sind α -helikale Bereiche, dunkelgrau β -Faltblattstrukturen. Die Vorhersage der Sekundärstrukturen erfolgte mittels Jpred3 (Cole *et al.*, 2008).

In Abbildung 46 ist deutlich zu erkennen, dass eine hohe Sekundärstrukturhomologie der dargestellten Proteine NirDLGH zu Lrp und AsnC vorliegt. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Proteine NirDLGH, insbesondere jedoch NirL und NirH, als Transkriptionsregulatoren charakterisiert wurden.

Obwohl keine enzymatische Aktivität der Proteine NirDLGH gezeigt werden konnte, wird nach aktuellem Stand der Forschung eine Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm vermutet (vgl. Kapitel 3.2.2). In Abbildung 47 ist ein Modell zur Funktionalität der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* dargestellt.

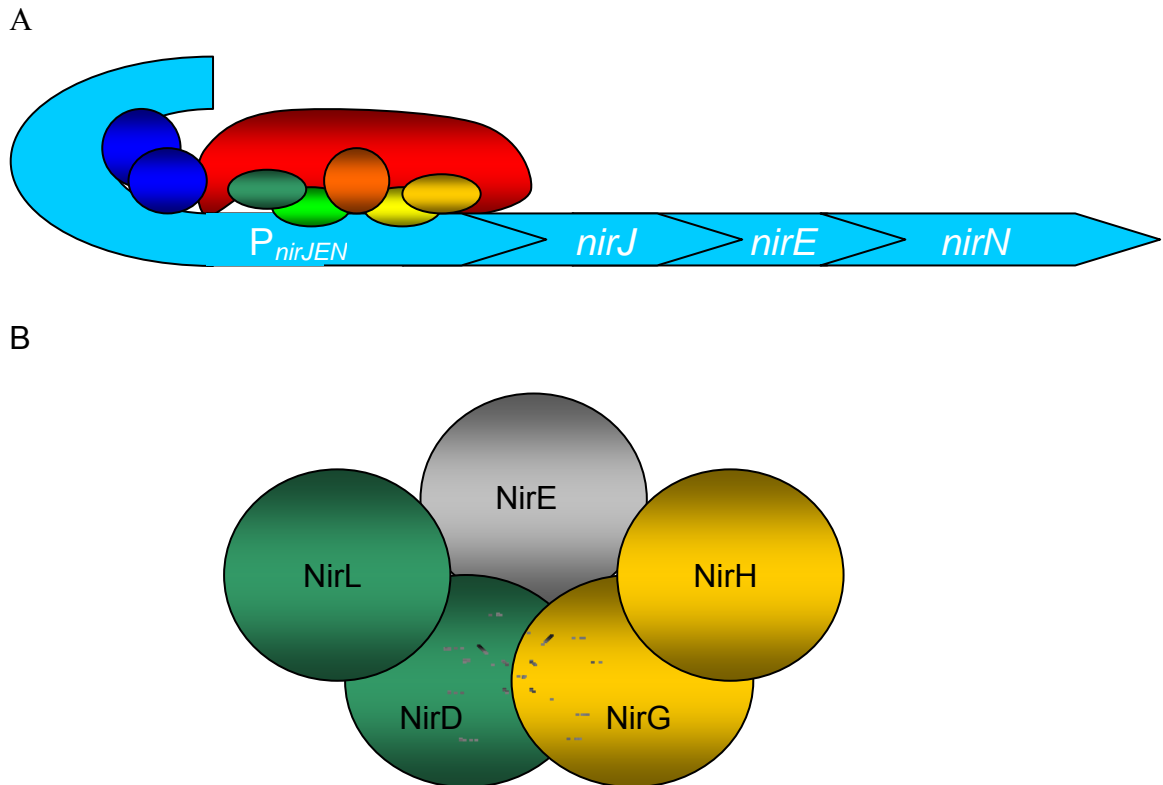


Abbildung 47: Modell zur Funktionalität der Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa*.
 A) Die DNA ist hellblau dargestellt. Der für die DNA-Biegung verantwortliche heterodimere IHF ist dunkelblau dargestellt. Die bakterielle RNA-Polymerase ist rot dargestellt, separat eingezeichnet ist die Sigma-Untereinheit (orange), welche den Transkriptionsstartpunkt erkennt. Grün und gelb dargestellt sind die heterodimeren Transkriptionsfaktoren NirD/L und NirG/H. Die DNA-Bindung erfolgt dabei nur über das Protein NirL bzw. NirH. Denkbar wäre eine unterstützende Funktion der Proteine NirD und NirG auf Grund der Sequenzhomologie. B) Nach Dissoziation der Proteinkomplexe NirD/L bzw. NirG/H (hier nicht dargestellt) wird das Substratmolekül Sirohäm gebunden und enzymatisch durch die homodimeren Proteine NirD und NirG decarboxyliert. Sowohl ein Multienzymkomplex (beispielsweise mit NirE, hier grau dargestellt) als auch eine unterstützende Funktion der Proteine NirL und NirH ist denkbar.

Eine Bestätigung der postulierten Funktionen von NirDLGH könnte mittels Strukturaufklärung der Proteine NirDLGH und Kokristallisation mit Sirohäm und/oder DNA erfolgen.

Abschließend werden die Ergebnisse dieser Arbeit, die Charakterisierung von NirDLGH als Transkriptionsregulatoren, in ihrem biologisch relevanten Kontext zusammengefasst.

Tritt in der Umwelt von *P. aeruginosa* Sauerstofflimitierung auf, so wird die Anr-/Dnr-Regulationskaskade wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben in Gang gesetzt. Die

Dnr-Aktivierung des *nir*-Operons in *P. aeruginosa* führt u.a. zur Bildung der Transkriptionsregulatoren NirDLGH. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Expression der Gene *nirJEN*, so dass verstärkt Uroporphyrinogen III in den Häm d_1 -Biosyntheseweg „abgeführt“ wird, da die gesteigerte Transkription des Gens *nirE* den ersten Schritt der Häm d_1 -Biosynthese fördert. Daher ist eine Feinregulierung an dieser Position des *nir*-Operons sinnvoll. Da Häm d_1 essentiell für die Denitrifikation ist und diese die bestmögliche Form der anaeroben Energiegewinnung darstellt (vgl. Kapitel 1.2), wäre ein Mangel an diesem Kofaktor ein starker Selektionsnachteil für das Bakterium. Der Häm d_1 -Einbau in NirS wird nach dem aktuellen Stand der Forschung durch NirN katalysiert und könnte, ebenso wie die komplizierte „*Radical-SAM*“-Reaktion katalysiert durch NirJ, einen limitierenden Schritt für die Bildung der aktiven Nitritreduktase darstellen (vgl. Kapitel 1.3) und somit dieser Feinregulation bedürfen. Wenn nun die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung erneut ansteigt, werden die Regulatoren Anr und Dnr inaktiv. Die Nitritreduktase NirS wird nicht mehr benötigt, so dass die Expression des *nir*-Operons eingestellt wird. Gleichzeitig werden die Transkriptionsregulatoren NirDLGH inaktiviert, so dass Uroporphyrinogen III nicht mehr in den Häm d_1 -Biosyntheseweg „abgeführt“ wird, und als Ausgangssubstanz für Tetrapyrrole der aeroben Atmung zur Verfügung steht.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich NirJ aus *H. thermophilus* als Eisen-Schwefel-Protein charakterisiert. Hierzu wurde das Protein NirJ in *E. coli* heterolog produziert und chromatographisch gereinigt. Anschließend wurde mittels Eisen- und Schwefelbestimmungen gezeigt, dass ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum pro NirJ vorliegt. UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen unterstützten diesen Befund. Eine biochemische Funktion konnte NirJ in einem *in vitro*-Aktivitätstest nicht zugeordnet werden.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* charakterisiert. Nach heterologer Produktion in *E. coli* und anschließender chromatographischer Reinigung konnte gezeigt werden, dass die Einzelproteine NirD, NirL, NirG und NirH als Homodimere vorliegen. Interessanterweise konnte ebenfalls das Auftreten von heterodimeren Proteinkomplexen NirD/L bzw. NirG/H gezeigt werden. Ein tetramerer Komplex wurde nicht beobachtet.

In einem *in vitro*-Aktivitätstest, in dem Precorrin-2, Sirohydrochlorin oder Sirohäm als mögliche Substrate eingesetzt wurden, konnte den Proteinen NirDLGH keine biochemische Funktion zugeordnet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mittels Primer-Extension-Analyse gezeigt, dass sich im *nir*-Operon von *P. aeruginosa* -42 bp *upstream* von *nirJ* ein Transkriptionsstartpunkt befindet. Dies deutet auf das Vorhandensein eines separaten *nirJEN*-Transkripts hin. Durch *lacZ*-Reportergenfusionen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des neu entdeckten *nirJ*-Promotors unter anaeroben Wachstumsbedingungen und in Gegenwart von Nitrat im Vergleich zu aeroben Bedingungen um das Dreifache induziert wird. Die Induktion erfolgt dabei durch die Proteine NirDLGH. Des Weiteren konnte durch Gelretardationsexperimente eine Bindestelle für die Proteine NirDLGH ca. -85 bp *upstream* von *nirJ* identifiziert werden. Dabei wurden die Einzelproteine NirL und NirH bzw. die Proteinkomplexe NirD/L und NirG/H als DNA-bindende Proteine identifiziert. Diese Tatsache konnte mittels initialer DNaseI-Protektionsanalysen verifiziert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Proteinen NirDLGH aus *P. aeruginosa* um Transkriptionsfaktoren handelt. Es sei erwähnt, dass eine zusätzliche

enzymatische Funktion der Proteine, wie in Kapitel 3 diskutiert, durchaus denkbar wäre.

Das Protein NirDL aus *H. thermophilus* wurde erfolgreich kristallisiert. Ein Datensatz mit einer Auflösung von 3.2 Å konnte aufgenommen werden. Derzeit wird die Struktur in Kooperation mit Dr. Stefan Schmelz am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig gelöst.

5. Summary

In this study it was possible to produce and purify recombinant NirJ from *H. thermophilus*. Through iron and sulfur determination it was shown that this protein contains one $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ cluster per molecule. This finding was substantiated by UV/Vis-spectroscopy. Yet, it was not possible to assign any enzymatic function to NirJ using an *in vitro* activity assay.

Further, the recombinant proteins NirD, NirL, NirG and NirH from *P. aeruginosa* were produced and purified to homogeneity revealing heterodimeric protein complexes between NirD/L and between NirG/H. The individual proteins NirD, NirL, NirG and NirH were shown to be homodimeric.

Using primer extension analysis a so far unrecognized transcription start site located 42 bp upstream of the *P. aeruginosa nirJ* gene was identified, indicating the presence of a separate *nirJEN* transcript. Using *lacZ*-reporter gene fusions it was shown that the expression of *lacZ*, which was placed under the control of the *nirJ* promoter, was increased by 3-fold under anaerobic growth conditions in the presence of nitrate relative to the level observed under aerobic growth conditions. *P. aeruginosa* NirDLGH were required for the anaerobic induction of the *nirJ* promoter. DNA retardation assays and DNaseI footprinting proved that NirL, NirH, NirD/L and NirG/H bind to DNA in a region approx. 85 bp upstream of *nirJ*.

Thus, the role of NirDLGH as transcription regulators in *P. aeruginosa* could be shown. It should be mentioned that an enzymatic function of those proteins as discussed in Chapter 3 might be feasible as well.

The *H. thermophilus* protein NirDL was crystallized. It was possible to record a data set with a resolution of up to 3.2 Å. The structure is being solved at the Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig in cooperation with Dr. Stefan Schmelz.

6. Ausblick

Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich für die anschließende Bearbeitung des Themas folgende mögliche Fragestellungen:

Detaillierte Charakterisierung des Proteins NirJ:

- a) Produktion und Reinigung des Proteins NirJ aus *P. aeruginosa* als Trx-Fusionsprotein.
- b) Chemische Synthese möglicher Zwischenprodukte der Häm d_1 -Biosynthese, z.B. 12,18-Didecarboxysirohäm. Diese wären in einem zu etablierenden *in vitro*-Aktivitätstest als Substrat einzusetzen.
- c) ESR-Spektroskopie des gereinigten NirJ zur Bestätigung des Vorhandenseins eines $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums.
- d) Kristallisation und Strukturaufklärung des Proteins NirJ. Hieraus könnten sich Hinweise auf die katalytische Funktion des Proteins ergeben.

Strukturelle Charakterisierung der Proteine NirDLGH:

- a) Strukturaufklärung des Proteins NirDL aus *H. thermophilus*.
- b) Weitere Kristallisationsversuche mit verkürzten NirD/L- bzw. NirG/H-Proteinkomplexen.
- c) Kristallisationsversuche der Einzelproteine NirD, NirL, NirG und NirH.

Charakterisierung der enzymatischen Funktion der Proteine NirDLGH:

- a) Chemische Synthese möglicher Zwischenprodukte der Häm d_1 -Biosynthese, z.B. Sirohäm. Diese wären in dem beschriebenen *in vitro*-Aktivitätstest als Substrat einzusetzen.

7. Literaturverzeichnis

- Allison, D. G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A. and Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* **167**: 179–184.
- Anderson, J. J., Quay, S. C. and Oxender, D. L. (1976). Mapping of two loci affecting the regulation of branched-chain amino acid transport in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **126**: 80–90.
- Anderson, L. A., Loehr, T. M., Wu, W., Chang, C. K. and Tomkovich, R. (1990). Modelling heme d_1 : the spectral properties of copper (II) porphyrindiones. *FEBS Lett.* **267**: 285–288.
- Arai, H., Sanbongi, Y., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1990). Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c_{551} from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **261**: 196–198.
- Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1995 a). Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett.* **371**: 73–76.
- Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1995 b). The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta.* **1261**: 279–284.
- Arai, H., Kodama, T. and Igarashi, Y. (1997). Cascade regulation of the two CRP/FNR related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol-* **25**: 1141–1148.
- Arai, H., Kodama, T. And Igarashi, Y. (1999). Effect of nitrogen oxides on expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **170**: 19–24.
- Arai, H., Mizutani, M. and Igarashi, Y. (2003). Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **149**: 29–36.
- Atkins, P. W. and de Paula, J. (2006). Physikalische Chemie. Wiley-VCH.
- Bali, S., Warren, M. J. and Ferguson S. J. (2010). NirF is a periplasmic protein that binds d_1 heme as part of its essential role in d_1 heme biogenesis. *FEBS J.* **277**: 4944–4955.
- Banin, E., Vasil, M. L. and Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 11076–11081.

- Banin, E., Brady, K. M. and Greenberg, E. P.** (2006). Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 2064–2069.
- Barkigia, K. M., Chang, C. K., Fajer, J. and Renner, M. W.** (1992). Models of heme d_1 . Molecular structure of NMR characterization of an iron(III) dioxoisobacteriochlorin (porpyhrindione). *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 1701–1707.
- Battersby A. R., Jones K., McDonald E., Robinson J. A. and Morris H. R.** (1977). The structures and chemistry of isobacteriochlorins from *Desulfovibrio gigas*. *Tetrahedron. Lett.* **25**: 2213–2216.
- Beale, S. and Castelfranco, P.** (1973). [^{14}C] Incorporation from exogenous compounds into 2-aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **52**: 143–149.
- Beale, S., Gough, S. and Granick, S.** (1975). Biosynthesis of 2-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 2719–2723.
- Becher, A., and Schweizer, H. P.** (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *Biotechniques* **29**: 948–950, 952.
- Beinert, H.** (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* **131**: 373–378.
- Berg, J. M., Stryer, L. and Tymoczko, J. L.** (2007) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Bonnet, R.** (1999). Photodynamic therapy in historical perspective, *Rev. Contemp Pharmacother* **10**: 1–17.
- Brindley, A., Zajicek, R., Warren, M. J., Ferguson, S. J. and Rigby, S. E. J.** (2010). NirJ, a radical SAM family member of the d_1 heme biogenesis cluster. *FEBS Letters.* **584**: 2461–2466.
- Brinkman, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J. H., Thomm, M., de Vos, W. M. and van der Oost, J.** (2000). An lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J. Biol. Chem.* **275**: 38160–38169.
- Bröcker, M.** (2006). Charakterisierung der lichtunabhängigen Protochlorophyllid Oxidoreduktase aus *Chlorobium tepidum*. *Diplomarbeit*. TU Braunschweig.
- Cain, R. B.** (2004). Biodegradation of detergents. *Curr. Opi. in Biotechnol* **5**: 266–274.

- Campodonico, V. L., Gadjeva, M., Paradis-Bleau, C., Uluer, A. and Pier, G. B.** (2008). Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med.* **14**: 120–133.
- Chang, C. K.** (1985). On the structure of heme d_1 . An isobacteriochlorin derivative as the prosthetic group of dissimilatory nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **260**: 9520–9522.
- Chang, C. K., Timkovich, R. And Wu, W.** (1986). Evidence that heme d_1 is a 1,3-porphyrindione. *Biochemistry* **25**: 8447–8453.
- Chen, C. F., Lan, J., Korovine, M., Shao, Z. Q., Tao, L. Zhang, J. and Newman E. B.** (1997). Metabolic regulation of *lrp* gene expression in *Escherichia coli* K12. *Microbiology* **143**: 2079–2084.
- Cole, C., Barber, J. D. and Barton, G. J.** (2008) The Jpred3 secondary structure prediction server. *Nucl. Acids. Res.* **36**: W197–W201.
- Cutruzzolá, F., Brown, K., Wilson, E.K., Bellelli, A., Arese, M., Tegoni, M., Cambillau, C. and Brunori, M.** (2001). The nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: essential role of two active-site histidines in the catalytic and structural properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 2232–2237.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., and Villemur, R.** (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3- hydroxyalkanoxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005–2013.
- Edman, P. and Begg, G.** (1967). A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* **1**: 80–91.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., and Schobert, M.** (2004). Longterm anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol.* **186**: 4596–4604.
- Frankenberg, N., Kittel, T., Hungerer, C., Römling, U. and Jahn, D.** (1998). Cloning, mapping and functional characterization of the *hemB* gene of *Pseudomonas aeruginosa*, which encodes a magnesium-dependent 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Mol Gen Genet.* **257**: 485–489.
- Friedman, D. I.** (1988). Integration Host Facotr: A Protein for All Reasons. *Cell* **55**: 545–554.
- Gädke, J.** (2011). Strukturelle und Biochemische Charakterisierung der potentiellen Sirohäm-Decarboxylasen NirGH aus *Pseudomonas aeruginosa* und NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus*. *Bachelorarbeit*. TU Braunschweig.
- Giardina, G., Rinaldo, S., Johnson, K. A., Di Matteo, A., Brunori, M., and Cutruzzola, F.** (2008). NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the transcriptional regulatorDNR. *J Mol Biol.* **378**: 1002–1015.

- Härtig, E., Schiek, U., Vollack, K.U. and Zumft, W.G.** (1999). Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**: 3658–3665.
- Hasegawa, N., Arai, H. and Igarashi, Y.** (1998). Activation of a consensus FNR-dependent promoter by DNR of *Pseudomonas aeruginosa* in response to nitrite. *FEMS Microbiol Lett.* **166**: 213–217.
- Hasegawa, N., Arai, H. and Igarashi, Y.** (2001). Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* **288**: 1223–1230.
- Hassett, D. J.** (1996). Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol.* **178**: 7322–7325.
- Heinemann, I.U., Jahn, M., and Jahn, D.** (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **474**: 238–251.
- Herbst, K., M. Bujara, A. K. Heroven, W. Opitz, M. Weichert, A. Zimmermann, and Dersch, P.** (2009). Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog.* **5**: e1000435.
- Heroven, A. K., G. Nagel, H. J. Tran, S. Parr, and Dersch, P.** (2004). RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **53**: 871–888.
- Heroven, A. K., and Dersch, P.** (2006). RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **62**: 1469–1483.
- Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M. R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. and Molin, S.** (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 2008–2017.
- Hirasawa-Soga, M., Tamura, G. And Horie, S.** (1983). Spectrophotometric and electron spin resonance studies on the substrate interactions of ferredoxin-linked nitrite reductases from spinach. *J. Biochem.* **94**: 1833–1840.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. and Schweizer, H. P.** (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. and Miller, S. I.** (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**: 1171–1175.

- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenthner, D., Bovee, D., Olson, M. V. and Manoil, C. (2003).** Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:14339–14344.
- Jahn, D., Verkamp, E. and Söll, D. (1992).** Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends in Biochemical Science* **17**: 215–219.
- Jahn, D., Hungerer, C., and Troup, B. (1996).** Unusual pathways and environmentally regulated genes of bacterial heme biosynthesis. *Naturwissenschaften* **83**: 389–400.
- Kawasaki, S., Arai, H., Igarashi, Y. and Kodama, T. (1995).** Sequencing and characterization of the downstream region of the genes encoding nitrite reductase and cytochrome c-551 (*nirSM*) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the gene necessary for biosynthesis of heme d₁. *Gene*. **167**: 87–91.
- Kawasaki, S., Arai, H., Kodama, T. and Igarashi, Y. (1997).** Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: Sequencing and identification of a locus for heme d₁ biosynthesis. *J Biochem*. **179**: 235–242.
- Kjelleberg, S. and Molin, S. (2002).** Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol*. **5**: 254–258.
- Koike, H., Sakuma, M., Mikami, A., Amano, N. and Suzuki, M. (2003).** A possible disk to cylinder transition assemblies of feast/famine regulatory protein, FFRPs. *Proc. Jpn. Acad*. **79**: 63–69.
- Körner, H., Sofia, H. J. and Zumft, W.G. (2003).** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev*. **27**: 559–592.
- Krieger, R., Rompf, A., Schobert, M. and Jahn, D. (2002).** The *Pseudomonas aeruginosa hemA* promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. *Mol Genet Genomics*. **267**: 409–417.
- Kuchma, S. L., Connolly, J. P. and O'Toole, G. A. (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. **187**: 1441–1454.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D., and Heinz, D.W. (2010).** Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci* **19**: 1137–1161.

- Lawrence, A. D. (2006).** Identification and characterization of redox enzymes associated with cobalamin (vitamin B12) biosynthesis. *PhD Thesis*. Queen Mary University, London.
- Leonard, P. M., Smits, S. H., J., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W. and Rafferty, J. B. (2001).** Crystal structure of the LRP-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO J.* **20**: 990–997.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998).** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.
- Lovenberg, W., Buchanan, B.B. and Rabinowitz, J.C. (1963).** Studies on the Chemical Nature of Clostridial Ferredoxin. *J Biol Chem* **238**: 3899–3913.
- Mann, S. (1966).** Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology* **54**: 184–190.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2002).** Brock. Biology of Microorganisms. Tenth Edition.
- Mah, T. F. and O'Toole, G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**: 34–39.
- McRee, D. E. (1993).** *Practical Protein Crystallography*. San Diego: Academic Press.
- Migrom, L. R. (2001).** The colors of life. An introduction to the chemistry of porphyrines and related compounds. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Miller, J. H. (1992).** A Short Course in Bacterial Genes: a Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Monroe, D. (2007).** Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* **5**: 2458–2461.
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M. and Jahn, D. (2005).** Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics.* **21**: 4187–4189
- Murphy, M. J., Siegel, L. M., Tove, S. R. und Kamin, H. (1974):** Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 612–616.
- Newman, E. B. and Lin, R. (1995).** Leucine-Responsive Regulatory Protein: A Global Regulator of Gene Expression in *E. coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 747–775.

- Nurizzo, D., Silvestrini, M. C., Magali, M., Cutrozzolá, F., Bougeois, D., Fülöp, V., Hajdu, J., Brunori, M., Tegoni, M. and Cambillau, C. (1997). N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*. **5**: 1157–1171.
- O'Sullivan, B. P. and Freedman, S. D. (2009). Cystic fibrosis. *Lancet* **373**: 1891–1904.
- Palmedo, G., Seither, P., Korner, H., Matthew, J. C., Burkhalter, R. S., Timkovich, R. und Zumft, W. G. (1995). Resolution of the *nirD* locus for hemde *d*₁ synthesis of cytochrome *cd*₁ (respiratory nitrite reductase) from *Pseudomonas stutzeri*. *Eur. J. Biochem.* **232**: 737–746.
- Platt, M. D., Schurr, M. J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Ibrulj, I., Potvin, E., Levesque, R. C., Fedynak, A., Brinkman, F. S. L., Schurr, J. et al. (2008). Proteomic, Microarray, and Signature-Tagged Mutagenesis Analyses of Anerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, Likely Representing Chronic, Late-Stage Cystic Fibrosis Airway Conditions. *J. Bac.* **190**: 2739–2758.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. and Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. **268**: 1899–1902.
- Raux, E., Leech, H. K., Beck, R., Schubert, H. L., Santander, P. J., Roesnner, C. A., Scott, A. I., Martens, J. H., Jahn, D., Thermes, C. et al. (2003). Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* **370**: 506–516
- Rhodes, G. (1993). *Crystallography Made Crystal Clear*. San Diego: Academic Press.
- Righetti, P., Gianazza, E., Gelfi, C. and Chairi, M. (1990). Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 2nd edition, Oxford University Press.
- Rinaldo, S., Arcovito, A., Brunori, M. and Cutruzzolá, F. (2007). Fast dissociation of nitric oxide from ferrous *Pseudomonas aeruginosa* *cd*₁ nitrite reductase: a novel outlook on the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **282**: 14761–14767.
- Rinaldo, S., Giardina, G., Castiglione, N., Stelitano, V. and Cutruzzolá, F. (2011). The catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* *cd*₁ nitrite reductase. *Biochem. Society Trans.* **39**: 195–200.
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D. G. and Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol.* **186**: 7312–7326.
- Sawers, R.G. (1991). Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **5**: 1469–1481.

- Schnell, R., Sandalova, T., Hellman, U., Lindqvist, Y. and Schneider, G.** (2005). Siroheme- and [Fe₄-S₄]-dependent NirA from *Mycobacterium tuberculosis* is a sulfite reductase with a covalent Cys-Tyr bond in the active site. *J Biochem.* **280**: 27319–27328.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M. and Jahn, D.** (2007). The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol.* **189**: 4310–4314.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. and Greenberg, E. P.** (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol.* **51**: 973–985.
- Sedelnikova, S. E., Smits, S. H. J., Leonard, P. M., Brinkman, A. B., van der Oost, J., Rafferty, J. B. and Rice, D. W.** (2001). Crystallisation and quaternary structure analysis of an Lrp-like regulatory protein from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Acta Cryst.* **57**: 886–888.
- Sharma, V., Noriega, C. E. and Rowe, J. J.** (2006). Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 695–701.
- Silvestrini, M. C., Falcinelli, S., Ciabatti, I., Cutruzzola, F. and Brunori, M.** (1994). *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie* **76**: 641–654.
- Siegel, L. M., Murphy, M. J. and Kamin, H.** (1973). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. *J. Biolog. Chem.* **248**: 251–264.
- Smith, A. and Warren, M. J.** (2009). Tetrapyrroles: Birth, Life and Death (Molecular Biology Intelligence Unit). Springer Verlag, Berlin.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. and Miller, N.E.** (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1097–1106.
- Spier, S.** (2007). Charakterisierung der Aminoacyl-Phosphatidylglycerol-Synthase Lmo1695 aus *Listeria monocytogenes*. *Diplomarbeit*. TU Braunschweig.
- Steen, A.** (2011). Contribution of the stringent response and ANR to anaerobic survival of Pseudomonads. *Doktorarbeit*. TU Braunschweig.
- Storbeck, S., Walther, J., Müller, J., Parmar, V., Schiebel, H. M., Kemken, D., Dülcks, T., Warren, M. J. and Layer, G.** (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* *nirE* gene encodes the S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase required for heme d₁ biosynthesis. *FEBS J.* **276**: 5973–82.

- Storbeck, S., Saha, S., Krausze, J., Klink, B. U., Heinz, D. W. and Layer, G.** (2011). Crystal structure of NirE in complex with its substrate reveals new insight into the catalytic mechanism of SAM-dependent uroporphyrinogen III methyltransferases. *J Biol Chem*. Accepted.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M. et al.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**: 959–964.
- Stryjewski, M. and Sexton, D. (2003)** *Pseudomonas aeruginosa* infections in specific types of patients and clinical settings. Severe Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Suzuki, M., Koike, H. and Aramaki, H.** (2003) Feast/famine regulatory proteins of a multiple drug resistant, *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Jpn. Acad.* **79**: 242–247.
- Swinger, K. K. and Rice, P. A.** (2003). IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Op. in. Struct. Biol.* **14**: 28–35.
- Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. and Moura, I.** (2006). Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem.* **100**: 2087–2100.
- Thauer, R.K., and Bonacker, L.G.** (1994). Biosynthesis of Coenzyme F430, a nickel porphyrinoid involved in methanogenesis. *Ciba Found Symp* **180**: 210–227.
- Thoma, S., and Schobert, M.** (2009). An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. *FEMS Microbiol. Lett.* **294**: 127–132.
- Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S. and Spormann, A. M.** (2005). Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol.* **187**: 1014–1021.
- Takahashi, Y. And Nakamura, M.** (1999). Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem.* **126**: 917–926
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**: 4350–4354.
- Van Delden, C. and Iglewski, B. H.** (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infect Dis.* **4**: 551–560.
- Van der Wauven, C., Pierard, A., Kley-Raymann, M., and Haas, D.** (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol.* **160**: 928–934.

- Vollack, K. U., Hartig, E., Korner, H. and Zumft, W. G.** (1999). Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. *Mol Microbiol.* **31**: 1681–1694.
- Vollhardt, K. P. C. and Schore, N. E.** (2000). Organische Chemie. *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim.
- Williams, H. D., Zlosnik, J. E. and Ryall, B.** (2007). Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol.* **52**: 1–71.
- Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D., Hancock, R. E. and Brinkman, F. S.** (2009). Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **37**: 483–488.
- Winteler, H.V. and Haas, D.** (1996). The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiology.* **142**: 685–693.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T. *et al.*** (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest.* **109**: 317–325.
- Xiong, J., C. E. Bauer, and Pancholy, A.** (2007). Insight into the haem *d*₁ biosynthesis pathway in heliobacteria through bioinformatics analysis. *Microbiology* **153**: 3548–3562.
- Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T.** (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **153**: 1318–1328.
- Yokoyama, K., Ishijima, S. A., Clowney, L., Koike, H., Aramaki, H., Tanaka, C., Makino, K. and Suzuki, M.** (2005). Feast/Famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 89–108.
- Zajicek, R. S., Bali, S., Arnold, S., Brindley, A., Warren, M. J. and Ferguson, S. J.** (2009). Functional analysis of NirC, NirE and NirN, products of three genes associated with *d*₁ heme biogenesis. *FEBS Journal* **276**: 6399–6411.
- Zulianello, L., de la Gorgue de Rosny, E., van Ulsen, P., van de Putte, P. and Goosen, N.** (1994). The HimA and HimD subunits of integrations host factor can specifically bind to DNA as homodimers. *EMBO J.* **13**: 1534–1540.
- Zumft, W.G.** (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**: 533–616.

- Zumft, W. G. und Kroneck, P. M. H.** (2006). Respiratory Transformation of Nitrous Oxide (N₂O) to Dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. *Advan. in. Micro. Physio.* **52**: 107–227.

Danksagung

Bei Frau Dr. Gunhild Layer möchte ich mich für die dreijährige Betreuung und Arbeit als Mentorin bedanken sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Dadurch war ich in der Lage, viel Neues zu lernen und mich, fachlich und persönlich, weiterzuentwickeln.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dieter Jahn für die Übernahme des Zweitgutachtens und dafür, dass er im Endspurt der Arbeit mit Unterstützung, langjähriger Erfahrung, Humor und nützlichen Tipps und Tricks zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Ralf Mendel bedanke ich mich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission bei meiner anstehenden Disputation.

Dem ganzen Institut für Mikrobiologie gilt mein Dank für eine sehr freundliche Arbeitsatmosphäre. Am meisten jedoch möchte ich mich bei Christina Nitzsche, Barbara Cwiklinski, Dagmar Rose und Bernd Hoppe bedanken. Vielen Dank für eure/Ihre Mühe und Geduld.

Besonderer Dank gilt unserer kleinen Arbeitsgruppe, der AG Layer. Danke, Sonja, Judith und Tristan für die Unterstützung, die aufmunternden Worte und Hilfestellungen. Insbesondere bei dir, Tristan, möchte ich mich bedanken, da du nicht nur ein Arbeitskollege, sondern auch ein richtig guter Freund geworden bist.

Auch meinen Bachelorstudenten Torsten, Marion und Johannes gebührt Dank, ebenso einer wahren „Flut“ von Praktikanten. Durch die Betreuung von euch konnte ich selber sehr viel lernen und ich hoffe, euch hat die Zeit bei uns in der AG Layer nicht nur Arbeit, sondern auch Freude bereitet.

Bei der Abteilung für Molekulare Infektionsbiologie des HZI, geführt von Prof. Dr. Petra Dersch, und der AG Härtig möchte ich mich für viel Unterstützung und Fachwissen in Bezug auf genregulatorische Analysen bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Dr. Hans-Martin Schiebel, Dr. Uli Papke und Dipl.-Chem. Alexander Neuman des Instituts für Organische Chemie der TU Braunschweig für massenspektrometrische Untersuchungen diverser Tetrapyrrolproben.

Ein riesiges Dankeschön geht an Dr. Stefan Schmelz der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie des HZI, der viel Arbeit in die Kristallisationsversuche und letztlich erfolgreiche Kristallisation investiert hat. Danke, dass du dir dieses Thema so zu Eigen gemacht hast, und für deinen Optimismus, wenn es mal wieder nur Salz war.

Weiterer Dank gilt der Biozentrum-Pokerrunde. Zahlreiche Abende mit euch im Seminarraum werden unvergesslich bleiben.

Bei Anna-Lena Kaufholz möchte ich mich für viele (persönliche) Gespräche, zahlreiche lustige Laborputztage und dafür bedanken, dass du einfach da warst. Vielen Dank, Anna! Viel Glück und eine tolle Zeit auf deinem Weg mit Torben!

Bei Jens Jäger möchte ich mich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und für viele Fernseh-, Film- und Kinoabende mit faszinierenden Gesprächen bedanken. Vergiss das Teekännchen nicht!

Besonders bedanken möchte ich mich bei René Iser. Unsere Schwimmvereine, Tauchreisen und Kinoabende machten uns zu richtig guten Freunden. Meinem besten Freund hier in Braunschweig. Danke!

Bei meiner Braunschweiger und Wolfenbüttler Verwandtschaft möchte ich mich für viele schöne Erlebnisse in den letzten 8 Jahren hier in Braunschweig und Umgebung bedanken.

Liebe Tati, du hast mich in den letzten Jahren nahezu jeden Tag gesehen und hast die Doktorarbeit und mein Fernstudium aus nächster Nähe miterlebt. Ich weiß, ich war nicht immer einfach in dieser Zeit und oftmals frustriert. Wie viel ich für dich empfinde ist schwer auszudrücken und zu privat für eine Danksagung. Daher ein Zitat aus einem meiner Lieblingsbücher, Kafka am Strand von Haruki Murakami:

„Weil jeder, der liebt, seine fehlende Hälfte sucht. Deshalb wirst du immer traurig, wenn du an den anderen denkst. Wehmut ergreift dich, als würdest du ein Zimmer betreten, das dir schon lange nicht mehr gehört.“

Danke, dass ich in dir meine fehlende Hälfte finden durfte!

Der allergrößte und zutiefst empfundene Dank gilt meiner engsten Familie:

Meinem Bruder, der aus Medizinersicht meine Arbeit betrachtete und mit dem ich in den letzten Jahren so viele schöne Urlaube erleben durfte und der nicht nur mein Bruder, sondern auch mein bester Freund ist.

Und meinen Eltern. Danke für alles, was ihr in den letzten Jahren mit mir durchgemacht und für mich getan habt. Das Ermöglichen meines Fernstudiums, die Unterstützung im Alltag und bei Frustrationserlebnissen im Labor und den unerschütterlichen Glauben an mich. Ich bin froh, in Zukunft wieder etwas näher an meinem Zuhause, bei euch, zu sein. Vielen Dank...für alles!

Lebenslauf



Schule/Ausbildung

seit Februar 2010	Fernstudium an der Euro-FH Hamburg. Fachrichtung: International Management. Angestrebter Abschluss: MBA
August 2008 – Juli 2011	Anfertigung der Doktorarbeit an der Technischen Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.
01. Juli 2008	Abschluss des Studiums der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig: Diplom Biotechnologe; Note 1,0
Januar – Juni 2008	Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. D. Jahn, Thema: „Charakterisierung der Aminoacyl-Phosphatidylglycerol-Synthasen aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> “
Oktober 2003	Beginn des Studiums der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig
Juli 2002 – März 2003	Grundwehrdienst
1993 – 2002	Staffelsee-Gymnasium Murnau, mathematisch naturwissenschaftliche Ausbildungsrichtung Abschluss der Schulausbildung: Allgemeine Hochschulreife; Note 1,6
1989 – 1993	Volksschule Murnau

Praktische Erfahrungen

August 2008 – Juli 2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Technischen Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie
2008 – 2010	Trainer der Leistungsgruppe Schwimmen, Technische Universität Braunschweig
2005 – 2008	Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter für Lehre und Forschung am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig
2005 – 2007	Architekturbüro Schleich & Walther, Bereich Controlling, Vergabe, Abrechnung
2004 – 2006	Tauchlehrer-Assistent, Sommerkurse an der Tauchschule Hippocampe, Korsika, Frankreich

Zusatzqualifikationen

EDV: MS Office: Word, Excel, Power Point 2010

Auslandsaufenthalt / Sprachen:

Juli 2000	Erfolgreiche Teilnahme am APIEL-Test, Grade 5 (Exzellent)
August 1999 – Juni 2000	Besuch der North West Highschool in Wichita, Kansas, USA. Certificate of Attendance und Teilnahme an der Graduation Ceremony
Sprachen:	Englisch sehr gut

Sport:

2005, 2006, 2011	Volkstriathlon Peine
2005 – 2008	Obmann Leistungsgruppe Schwimmen, Technische Universität Braunschweig
2004 - 2007, 2009	Teilnahme an den Deutschen Hochschulmeisterschaften Schwimmen

Hobbys: Tauchen, Skifahren, Schwimmen, Reisen, Lesen